



Cátia Sofia da Costa Rocha

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Lesões inteligentes em DNA

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Maria de Fátima Raposo. FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca.

Arguente: Prof. Doutor Paulo Manuel Assis Loureiro Limão Vieira

Vogal: Prof. Doutora Maria de Fátima Guerreiro da Silva Campos Raposo



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Dezembro 2011



Cátia Sofia da Costa Rocha

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Lesões inteligentes em DNA

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Maria de Fátima Raposo. FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca.

Arguente: Prof. Doutor Paulo Manuel Assis Loureiro Limão Vieira

Vogal: Prof. Doutora Maria de Fátima Guerreiro da Silva Campos Raposo



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Dezembro 2011

Lesões inteligente em DNA

Copyright©2011 - Todos os direitos reservados. Cátia Sofia da Costa Rocha.
Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*O fim duma viagem é apenas o começo doutra.
É preciso recomeçar a viagem.
Sempre.”*

José Saramago

*A todos aqueles que me ajudaram a construir
este futuro*

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Doutora Maria Raposo, todo o apoio, dedicação e empenho que teve neste projecto. Agradeço as palavras de incentivo, todos os bons conselhos e ensinamentos e momentos de boa disposição.

Ao Prof. Doutor Paulo Ribeiro, o companheirismo, os momentos de descontração e risadas, essenciais para um bom ambiente em equipa.

A todos os elementos da linha 5 do CEFITEC, pela ajuda que me deram, pela sua prontidão e pelas palavras de apoio. Em especial à Andreia Arrimar, ao Luís Abegão e ao Jorge Ribeiro, por todas as longas conversas e conselhos para a vida. Ao Sr. Arez e ao Prof. Doutor João Lourenço pela sua total disponibilidade.

Ao REQUIMTE/DQ pela disponibilização dos espectrofotómetros para a realização das medidas essenciais a este projecto, em especial ao Prof. Doutor João Sotomayor e Doutor Filipe Folgosa por toda a paciência e tempo dispensado.

A todos os meus Professores pelos ensinamentos e palavras amigas sem os quais nunca chegaria a esta fase da minha vida.

A todos os meus Amigos de curso, que tornaram este percurso de 5 anos mais fácil de percorrer e por todo o companheirismo, união e momentos fantásticos.

À Joana Pereira, Mário Oliveira e Pedro Mendes, por todos os momentos de boa disposição e parvoíce, por todas as brincadeiras e pela sua amizade.

Aos meus Amigos de sempre, Zé, Tiago, Diana, Miguel, Viviana e Inês, pelas palavras de ânimo e encorajamento para encarar todo este trabalho de estudante com mais alegria e força.

À minha “irmã” Filipa, pelo companheirismo de uma vida de estudante desde o seu início até ao fim, pelas palavras ditas quando eram precisas, pelo apoio, pelos bons e maus momentos, e pela sua presença constante na minha vida. Ao “pai” Caeiro, por me acolher na família e pelas suas sábias palavras.

Aos meus pais, Artur e Olga Rocha, pelos ensinamentos de uma vida, pela educação e valores que me inculcaram, por todo o apoio e suporte ao longo destes anos de estudo. Por todas as noites mal dormidas, pelas alegrias de uma vida e por estarem sempre disponíveis.

À minha irmã e amiga Andreia e ao meu cunhado Miguel, por todo o apoio, risadas e bons momentos, e também pelos bons conselhos e paciência.

A toda a minha família pelo suporte e palavras de amizade, pelos convívios e incentivos, e pelo carinho.

A todos aqueles presentes na minha vida que, de alguma forma, contribuíram para a pessoa que sou hoje.

Resumo

Esta dissertação descreve o efeito da radiação ultravioleta (UV) em filmes finos de ácido desoxirribonucleico (DNA), na presença do intercalante azul de metileno (MB). A motivação principal foi a de se estudar a influência do agente intercalante MB na indução de lesões inteligentes no DNA, inibidoras da replicação e que portanto contribuam para a não proliferação de células cancerígenas. Para este estudo recorreu-se à técnica de produção de filmes finos de DNA e de DNA+MB obtidos por derramamento que foram irradiados com radiação UV na ausência e presença de água, sendo os danos causados pela irradiação caracterizados por espectrofotometria de infravermelho. Os resultados experimentais permitiram concluir que a radiação UV está na origem de lesões no DNA tanto na suas bases e grupos fosfato do DNA, como também na sua estrutura, quer na presença ou não do intercalante, sendo estes danos muito menores na ausência de moléculas de água. Contudo, o intercalante MB tem uma acção protectora, observando-se menor magnitude na degradação do DNA quando na sua presença. Para melhor se entenderem os mecanismos envolvidos na interacção dos diferentes constituintes do DNA com a radiação UV, também se estendeu o estudo a soluções aquosas de DNA e das bases azotadas, na presença e ausência de MB. Assim, foram irradiadas soluções de DNA, DNA+MB, MB e bases azotadas e posteriormente analisadas as alterações nos seus espectros de UV-Vis. Relativamente às soluções de DNA e de DNA+MB, observou-se uma maior degradação na primeira solução, corroborando o facto de o intercalante ter uma acção protectora do DNA. Na solução aquosa de MB, verificou-se, que quando exposta à luz UV, esta perde a sua coloração, indicando fotodegradação desta molécula. No que diz respeito às bases, a adenina e a timina apresentaram uma maior acção da radiação enquanto que a citosina e guanina sofreram alterações na sua estrutura sendo que, neste caso, o intercalante apresentou acção protectora, já que apresentaram degradação mesmo na sua presença.

Palavras-chave: ácido desoxirribonucleico, azul de metileno, radiação ultravioleta, bases (adenina, timina, guanina e citosina), FT-IR e UV-Vis

Abstract

This thesis describes the effect of ultraviolet (UV) in thin films of deoxyribonucleic acid (DNA) and in the presence of intercalant methylene blue (MB). The main motivation was to study the influence of intercalating agents in induction of smart lesions in DNA, inhibiting its replication and therefore contribute to the non-proliferation of cancer cells. For this study, cast films technique was used to produce films of DNA and DNA+MB obtained by solution depositing. The films were irradiated with UV in the absence and presence of water. Damage caused by radiation was characterized analyzing the films infrared spectra. The experimental results revealed that UV radiation gives rise to DNA lesions in both DNA bases and phosphate groups in both the presence or absence of intercalant, which are more significant in the presence of water molecules. However, the intercalante MB has a protective action since damage to DNA is less significant in his present. To better understand the mechanism involved in the interaction of different components of the DNA with UV radiation, the study was also extend to aqueous solutions of DNA and bases in the presence and absence of MB. the solutions UV-Vis spectra was used to monitor the effect of UV radiation. For DNA and DNA+MB solutions larger degradation was observed for the DNA solution when compared with DNA+MB solutions, corroborating that the intercalant have a protective action on DNA. Photodegradation of MB solutions was observed as a result of UV radiation exposure as revealed by solution decoloration. With respect to the bases, adenine and thymine showed more damaged by action of UV radiation, in this case the intercalant have a protective action. While cytosine and guanine have their structure changed.

Keywords: deoxyribonucleic acid, methylene blue, ultraviolet radiation, bases (adenine, thymine, guanine and cytosine), FT-IR and UV-Vis

Índice de Matérias

1	Introdução.....	1
2	Terapêutica com intercalantes	5
2.1	Efeitos da Radiação ultravioleta no DNA	5
2.2	Intercalantes/Fotossensibilizadores	9
3	Descrição do método experimental.....	13
3.1	Técnicas de caracterização das amostras	13
3.1.1	Espectrofotometria de UV-Vis.....	13
3.1.2	Espectrofotometria de Infravermelho por transformada de Fourier	15
3.2	Fonte de irradiação.....	17
3.3	Métodos de preparação das amostras.....	18
3.3.1	Azul de metileno.....	19
3.3.2	DNA	21
3.3.3	Bases do DNA.....	22
3.3.4	Lavagem e armazenamento de substratos.....	24
3.3.5	Preparação de filmes finos pela técnica de derramamento.....	24
3.3.6	Preparação das soluções em estudo, de DNA, de DNA com azul metileno e das bases	25
4	Caracterização por FT-IR.....	27
4.1	Irradiação por UV de amostras secas de DNA e de DNA com MB	27
4.2	Irradiação por UV de amostras na presença de água	31
4.3	Irradiação de soluções para posterior preparação de filmes finos por derramamento	38
4.4	Conclusões	40
5	Caracterização por UV-Vis.....	43
5.1	Efeito da radiação UV no azul de metileno	43
5.2	Efeito da radiação UV em soluções de DNA e de DNA+MB	46
5.3	Efeito da radiação UV das bases do DNA	48
5.3.1	Caracterização espectrofotométrica.....	49

5.3.2	Comparação de resultados	55
5.4	Conclusão.....	59
6	Conclusão.....	61
6.1	Conclusão.....	61
6.2	Trabalhos futuros.....	62
7	Referências	63

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Espectros de absorção das diferentes bases azotadas dos ácidos nucleicos. Adaptado de [15].	6
Figura 2.2 – Estrutura química das purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (timina, citosina e uracilo).	7
Figura 2.3 - Formação de lesões de DNA induzidas por radiação UV: os dímeros de pirimidina ciclobutano. Os dímeros podem-se formar entre duas pirimidinas adjacentes após a absorção de luz UV. Tem-se (A) Dímeros de pirimidina ciclobutano timina - timina e (B) Dímero timina – citosina [17].	8
Figura 2.4 - A radiação UV induz a formação de 6-4 fotoprodutos e consequentemente de isómeros de valência de Dewar; estes são formados nas zonas 5'-T-C-3', 5'-C-C-3', 5'-T-T-3' do DNA mas não em 5'-C-T-3'. [17]	8
Figura 2.5 - Os três modelos principais para a ligação de um intercalante ao DNA a) Intercalação; b) Ligação de superfície (<i>Groove binding</i>) e c) Ligação externa (<i>External binding</i>). Adaptado de [22]	10
Figura 2.6 - Esquema da fotoquímica básica de azul de metileno. O MB é activado para o estado singuleto (^1MB) pela luz. ^1MB pode decair com igual probabilidade de volta ao estado fundamental ou para um estado de tripleto (^3MB). O ^3MB pode reagir conforme reacções do tipo II (reagindo com o oxigénio para formar oxigénio no estado singuleto ($^1\text{O}_2$) e MB estado fundamental) ou, alternativamente, em um processo muito mais lento para formar superóxido e MB. Alternativamente, o ^3MB também pode reagir de acordo com reacções do tipo I (Reacções com átomos de hidrogénio ou por processos de transferência de electrões). [16]	11
Figura 3.1 - Representação esquemática de um espectrofotómetro de UV-Vis.	15
Figura 3.2 - Vibração por estiramento: simétrico e assimétrico.	16
Figura 3.3 - Representação esquemática dos quatro modos de vibração por deformação: Tesoura, <i>Twist</i> , Rotação e <i>Wag</i> . Adaptado de [26].	16
Figura 3.4 - Descrição matemática da Irradiância para uma fonte de radiação ideal e linear.	18
Figura 3.5 - Representação esquemática da estrutura química do azul de metileno.	19
Figura 3.6 - Espectros UV-Vis de soluções de azul de metileno com diferentes concentrações para o estudo do coeficiente de absorção molar.	19
Figura 3.7 - Representação das absorvâncias a diferentes comprimentos de onda: 246 nm, 292 nm, 610 nm e 665 nm, em função da concentração de azul de metileno. As linhas contínuas representam as rectas de ajuste aos pontos experimentais. Valores obtidos experimentalmente e complementados com os valores obtidos em [7].	20

Figura 3.8 - Representação esquemática da molécula de DNA.	22
Figura 3.9 - Representação esquemática da estrutura da molécula de adenina.	22
Figura 3.10 - Representação esquemática da estrutura da molécula de guanina.	23
Figura 3.11 – Representação esquemática da estrutura da molécula de timina.	23
Figura 3.12 - Representação esquemática da estrutura da molécula de citosina.	23
Figura 4.1 - Espectros de absorvância de filmes de a) DNA e de b) DNA+MB produzidos por derramamento e irradiados com luz UV por 2 e 10 horas.	27
Figura 4.2 - Rácios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 966 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} e 1088 cm^{-1} relativamente ao pico 1018 cm^{-1} de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB irradiada por luz UV em diferentes intervalos de tempo.	30
Figura 4.3 - Rácios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 1238 cm^{-1} , 1487 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} relativamente ao pico 1018 cm^{-1} de amostras de a) DNA e b) DNA e MB irradiados por luz UV por diferentes intervalos de tempo.	31
Figura 4.4 - Espectros de absorvância de um filme de a) DNA e de b) DNA e MB produzidos por derramamento e irradiados com luz UV por mais 10 e 30 horas na presença de água.	32
Figura 4.5 - Rácios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 966 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} e 1088 cm^{-1} relativamente ao pico 1018 cm^{-1} de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB irradiado por luz UV em diferentes intervalos de tempo.	33
Figura 4.6 - Rácios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 1238 cm^{-1} , 1487 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} relativamente ao pico 1018 cm^{-1} de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB irradiado por luz UV em diferentes intervalos de tempo.	33
Figura 4.7 - Espectros de absorvância de um filme de DNA de a) 950 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} normalizado a 1090 cm^{-1} , e b) de 1300 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} normalizado a 1660 cm^{-1} produzido por derramamento e irradiado com luz UV na presença de água.	35
Figura 4.8 - Espectros de absorvância de um filme de DNA e MB de a) 950 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} normalizado a 1090 cm^{-1} , e b) de 1300 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} normalizado a 1660 cm^{-1} , produzido por derramamento e irradiado com luz UV na presença de água.	35
Figura 4.9 - Rácios das intensidades normalizadas de picos de infravermelho 1014 cm^{-1} e 1067 cm^{-1} , relativamente ao pico de 1090 cm^{-1} de uma amostra de um filme de derramamento de a) DNA e de b) DNA e MB, e irradiado com radiação UV de 254 nm em diferentes intervalos de tempo.	36
Figura 4.10 - Rácios das intensidades normalizadas de picos de infravermelho 1489 cm^{-1} , 1531 cm^{-1} e 1607 cm^{-1} relativamente ao pico de 1660 cm^{-1} de uma amostra de um filme por	

derramamento de a) DNA e b) DNA e MB, e irradiado com radiação UV de 254 nm em diferentes períodos de tempos.....	37
Figura 4.11 - Espectros de absorvância de filmes de a) DNA e b) DNA+MB produzidos por derramamento e irradiado com luz UV normalizados a 1240 cm^{-1}	38
Figura 4.12 - Rácios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 966 cm^{-1} e 1016 cm^{-1} relativamente ao pico 1090 cm^{-1} de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB cuja solução foi previamente irradiada em diferentes intervalos de tempo.	39
Figura 4.13 - Rácios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 1494 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} relativamente ao pico 1660 cm^{-1} de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB cuja solução foi previamente irradiada em diferentes intervalos de tempo.	40
Figura 5.1 - Espectros de absorvância de UV-Vis de uma solução de MB de concentração $10\text{ }\mu\text{M}$ após diversos intervalos de tempo de irradiação por UV.	44
Figura 5.2 - Variação da intensidade de absorvância das bandas características do intercalante azul de metileno no tempo. Os valores estão normalizados ao valor inicial.	45
Figura 5.3 - Espectros de absorvância de UV-Vis de uma solução de a) DNA e de b) DNA com azul de metileno, após ter sido irradiada por luz UV por diversos períodos de tempo.....	46
Figura 5.4 - Variação da intensidade normalizada a) da banda a 260 nm do espectro do DNA e do DNA+MB e b) e das bandas a 610nm e 669nm da solução de DNA e MB.....	47
Figura 5.5 - Espectros de UV-Vis da base Adenina a) sem MB e b) com MB, após irradiada por UV por diversos períodos de tempo.....	49
Figura 5.6 - Espectros de UV-Vis da base timina a) sem MB e b) com MB, após irradiada por UV por diversos períodos de tempo.....	49
Figura 5.7 - Espectros de UV-Vis da base citosina a) sem MB e b) com MB, após irradiada por UV por diversos períodos de tempo.....	50
Figura 5.8 - Espectros de UV-Vis da base guanina a) sem MB e b) com MB, após irradiada por UV por diversos períodos de tempo.....	50
Figura 5.9 - Variação da intensidade das a) bandas características da base adenina ao longo do tempo (picos a 207 nm e 260 nm) com e sem MB e b) dos picos característicos do MB.	51
Figura 5.10 - Variação da intensidade a) das bandas características da base timina com e sem MB e b) das bandas características do MB ao longo do tempo.	52
Figura 5.11 - Variação do comprimento de onda referente à banda de 266 nm da citosina, e variação do valor de absorvância da banda a 260 nm na ausência e presença do intercalante.	53

Figura 5.12 – Variação dos picos característicos do azul de metileno em solução de citosina em função do tempo de irradiação.....	54
Figura 5.13 - Variação da intensidade das bandas de uma solução de base guanina e azul de metileno	55
Figura 5.14 – Rácios de absorvância normalizada do pico a 260 nm da a) solução de DNA, adenina, timina e citosina e b) nas mesmas soluções, mais a guanina, mas com o intercalante MB.	56
Figura 5.15 - Rácios de absorvância normalizada do pico a) a 610 nm e a b) 665 nm do intercalante em soluções das quatro bases e de DNA.	56
Figura 5.16 – Rácios de absorvância da razão entre os picos 610 nm e 665 nm para as diferentes amostras estudadas.	57

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Resumo das transições electrónicas associadas a regiões do espectro electrónico.	14
Tabela 3.2 - Parâmetros obtidos através das rectas de calibração das diferentes soluções de MB para os comprimentos de onda de 246 nm, 292 nm, 610 nm e 665 nm, onde ϵ o coeficiente de absorção no comprimento de onda e R o coeficiente de correlação	21
Tabela 4.1 - Números de onda e respectivas assinaturas espectrais de azul de metileno e ácido desoxirribonucleico por análise de infravermelho [33-36].	28
Tabela 5.1 – Bandas características do azul de metileno e respectivas transições electrónicas e vibracionais. [37].....	44
Tabela 5.2 – Bandas características de um espectro de UV-Vis de DNA. [33]	47
Tabela 5.3 – Tempos de decaimento, em minutos, dos principais picos de absorvância das diferentes soluções estudadas por UV-Vis.	58
Tabela 5.4 – Resumo do decréscimo da intensidade do pico a 260 nm das bases azotadas e do DNA, e o respectivo tempo de decaimento, como também o efeito do intercalante.	59

Simbologia e Notações

α	Ângulo alfa
ϵ	Coeficiente de absorção molar
ϵ	Coeficiente de extinção a um determinado comprimento de onda
h	Constante de Planck, $6,626 \times 10^{-34}$ Js
λ	Comprimento de onda
ν	Frequência
A	Adenina
Abs	Absorvância
C e []	Concentração da solução
C	Citosina
D	Dose de Irradiação
DQ	Departamento de Química
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CaF ₂	Fluoreto de cálcio
CEFITEC	Centro de Física e Inovação Tecnológica
E	Energia
FCT/UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
G	Guanina
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
I	Irradiancia
IV	Infravermelho
M	Molar (mol/dm ³)

Lesões inteligentes em DNA

MB	<i>Methylene blue</i> – Azul de metileno
mol	Mole ou unidade de quantidade química
MΩ	Mega Ohm
$^1\text{O}_2$	oxigénio no estado singuleto
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i> – Terapêutica fotodinâmica
R	Coeficiente de Correlação
REQUIMTE	Rede de Química e Tecnologia
T	Timina
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta/Visível
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
Vis	Visível

1 Introdução

A terapia fotodinâmica (PDT) foi proposta, há mais de 25 anos, como sendo uma ferramenta útil em oncologia, mas só recentemente está a ser usada de uma forma mais ampla a nível clínico. A compreensão dos princípios biológicos da PDT é cada vez mais profunda, facto que levou ao desenvolvimento de sistemas de tratamento mais eficientes, baratos e seguros [1].

A PDT envolve a administração de um composto fotossensibilizador e a sua acumulação nas células-alvo, seguida da irradiação da lesão com luz visível, [2] de forma a causar danos selectivos nessas mesmas células. [1] Uma concentração adequada de oxigénio molecular também é necessária para provocar os danos nos tecidos. Se qualquer um desses componentes se encontra ausente, nenhum efeito é produzido e, consequentemente, a eficácia global do tratamento é comprometida, sendo assim esta terapia requer um planeamento cuidadoso de ambos, os medicamentos e a dosimetria de luz [1].

Um fotossensibilizador absorve a energia directamente de uma fonte de luz, podendo depois transferi-la para o oxigénio molecular para dar origem a oxigénio no seu estado singuleto ($^1\text{O}_2$). A molécula $^1\text{O}_2$ é extremamente electrofílica e pode oxidar directamente as ligações duplas nas moléculas biológicas e macromoléculas, o que faz com que seja considerado o principal agente citotóxico relacionado com a PDT. Por outro lado, um fotossensibilizador activado poderá também conduzir à produção de espécies reactivas por transferência de electrões, as quais podem provocar danos nas células-alvo. É difícil estabelecer qual destes mecanismos é mais prevalente *in vivo*, sendo provável que ambos os processos levem à morte celular [3].

Há já alguns anos que o estudo da interacção de várias moléculas corantes com o DNA tem despertado grande interesse na comunidade científica, essencialmente por permitir a compreensão das interacções de medicamentos com o DNA e o consequente desenvolvimento de novos e mais eficientes medicamentos direccionados para o mesmo, tal como a terapia fotodinâmica que combina a luz e medicamentos para o tratamento de tumores malignos e cancro. [4]

Do mesmo ponto de vista da radioterapia, a quimioterapia tem como alvo específico o DNA. Actualmente, existem muitos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso oncológico, cujo alvo principal é o DNA [5], dos quais podemos salientar os compostos intercalantes e os compostos alquilantes. Os compostos intercalantes

Lesões inteligentes em DNA

1 Introdução

têm a capacidade de se inserirem paralelamente, sem formar ligações covalentes, no sulco da cadeia de DNA, permitindo assim uma maior exposição das bases ao meio envolvente, onde se encontram os agentes nocivos. Relativamente às moléculas alquilantes, estas formam ligações covalentes com as bases do DNA, impedindo e inibindo o ciclo celular, nomeadamente os processos de replicação [6].

O azul de metileno (MB) é uma molécula que tem vindo a desempenhar um papel de extrema importância nas áreas de Microbiologia e Farmacologia, tendo sido amplamente utilizado para corar organismos vivos, para tratar inúmeras doenças, e ultimamente tem sido, de igual modo, considerado como um medicamento utilizado na PDT [3], isto porque esta molécula é um intercalante fotossensibilizador que interage com o DNA. [4]

Recentemente, Coelho [7] estudou a interacção entre DNA e MB que permitiu identificar algumas das ligações entre estas moléculas bem como iniciou o estudo do efeito da radiação UV no DNA quando o MB está presente, tendo verificado que os grupos de ribose no DNA são os mais afectados pela radiação UV, uma vez que é possível a abertura dos anéis da ribose; também os grupos fosfatos são particularmente lesados, sendo possível quebrá-los. Em relação ao DNA não foi possível concluir acerca da desnaturação das cadeias. Quanto ao azul de metileno os dados obtidos por Coelho levam a afirmar que a radiação UV tem efeito destrutivo na molécula. No entanto, os dados obtidos não foram conclusivos necessitando este tema de uma recolha de dados mais exaustiva.

Assim, com o intuito de se compreender o efeito da radiação UV em amostras de DNA e de azul de metileno, o objectivo deste trabalho consistia em estudar a influência da radiação UV no DNA, bem como no complexo que este forma com o intercalante azul de metileno e com as bases do DNA isoladas, de forma a melhor compreender como é que este intercalante pode provocar lesões no DNA. Para tal, recorreu-se à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) em filmes finos de azul de metileno e ácido desoxirribonucleico produzidos por técnicas de derramamento, e à espectrofotometria por ultravioleta-visível (UV-Vis) de soluções de DNA e das suas bases.

Esta dissertação encontra-se dividida em mais 5 capítulos. No Capítulo 2 são introduzidas noções teóricas para a compreensão de conceitos que vão ser usados ao longo da mesma, tais como, mecanismos de interacção da radiação UV com a matéria, terapia anti-tumoral com uso de radiação e acção de intercalantes. No Capítulo 3 é descrito todo o procedimento experimental, nomeadamente os métodos de preparação de soluções e amostras, sendo também feita uma breve descrição dos princípios de funcionamento e características dos espectrofotómetros usados. O Capítulo 4 consiste na caracterização por FT-IR dos filmes finos de DNA e MB após irradiação com luz UV; enquanto o Capítulo 5 consiste

Lesões inteligentes em DNA

1 Introdução

na caracterização das amostras por radiação UV-Vis e no estudo da sua cinética após irradiação com luz UV. Finalmente, no Capítulo 6 são feitas as conclusões do trabalho, bem como mencionadas as perspectivas futuras relativamente ao desenvolvimento da tese.

Lesões inteligentes em DNA

1 Introdução

2 Terapêutica com intercalantes

Neste capítulo serão abordados os conceitos necessários à compreensão dos mecanismos de interacção da radiação com a matéria. Abordar-se-ão ainda, sucintamente, os conceitos de compostos intercalantes e os efeitos biológicos da radiação UV no DNA e suas bases.

2.1 Efeitos da Radiação ultravioleta no DNA

A radiação solar constitui um importante factor natural do clima da Terra influenciando significativamente o ambiente [8]. A nossa biosfera é protegida pela camada de ozono da radiação ultravioleta (UV) mais energética presente na atmosfera. No entanto, a radiação UV menos energética penetra através da camada e é capaz de iniciar uma infinidade de reacções fotoquímicas nos organismos que colonizam a superfície da Terra [9]. Por isso mesmo, a radiação UV tem vindo a ser objecto de estudo nos últimos anos, de forma a ser possível compreender o seu carácter mutagénico, citotóxico e carcinogénico, demonstrando igualmente o carácter letal desta radiação sobre o material genético [10]. Deve-se ter em conta que o cancro foi responsável por 7,1 milhões de mortes em todo o mundo, em 2002, é considerado como três das dez principais causas de morte de pessoas com mais de 60 anos e que as suas causas ainda não são claras, julgando-se que existem muitos factores que estimulam comportamentos cancerígenos, incluindo alterações no DNA celular a partir de: químicos cancerígenos ou mutagénicos, vírus e radiação. Os efeitos mais drásticos da exposição à radiação UV são o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogénese. No corpo humano existe a melanina que protege dos efeitos prejudiciais da radiação UV, actuando como um filtro que limita a penetração dos raios UV através da epiderme. Para além disso, também elimina espécies reactivas de oxigénio induzidas pela radiação UV que causam peroxidação lipídica e proteica e danos no DNA [11].

A compreensão dos diversos mecanismos de degradação e indução de lesões no DNA devem-se à descoberta da estrutura do DNA como uma cadeia de dupla hélice e a posterior relação do mesmo no controlo das funções celulares [12]. O DNA tornou-se assim uma fonte de investigação para o tratamento de inúmeras doenças de origem genética, sendo de salientar o seu papel no desenvolvimento das doenças cancerígenas.

Efeitos genotóxicos das diferentes regiões do espectro da luz UV são mediados por diferentes mecanismos. Os principais produtos dos danos causados no DNA pela luz UV a

Lesões inteligentes em DNA

2 Terapêutica com intercalantes

200-280 nm (ultravioleta C) são os dímeros de pirimidina formado no DNA após a absorção de luz UV. As radiações ultravioleta A (320-400 nm) e ultravioleta B (280-320 nm), que não são absorvidos pelos ácidos nucleicos, podem induzir nas células uma cascata de fotoreações acompanhada pela produção de espécies reactivas de oxigénio (EROs). No entanto as células têm os seus mecanismos de reparação de DNA. Assim quando há formação de dímeros de pirimidina, estes são reparados pelos sistemas de reparo por excisão, enquanto os produtos resultantes de um ataque de DNA pelos radicais livres, especialmente nas ligações com proteínas e ligações cruzadas, são reparados de forma menos eficaz e com provável ocorrência de erros por parte dos sistemas de reparo. Portanto, o ultravioleta C é um indutor de lesões no DNA e consequentemente carcinogénico. [13]

A radiação UVB é a componente mais energética da radiação solar que atinge a superfície da Terra. As principais reacções fotoquímicas no DNA celular envolvem principalmente a absorção directa de fotões UVB pelas bases, principalmente pelas pirimidinas, ou seja, pela citosina e timina (fig.2.2). Recentemente, foi demonstrado que bases purinas (adenina e guanina, fig. 2.2) também podem ser alvo da radiação UVB, embora em menor escala, em resultado da absorção directa de fotões na faixa de comprimento de onda 290 a 320 nm. Importa referir que a maioria dos estudos anteriores têm envolvido o uso de luz UVC (254 nm), embora essa radiação não seja biologicamente relevante para a exposição ao sol. Não obstante, as reacções fotoquímicas são mais eficientes neste comprimento de onda, visto ocorrerem perto do máximo de absorção das pirimidinas e purinas, tal como se verifica na figura 2.1. [14]

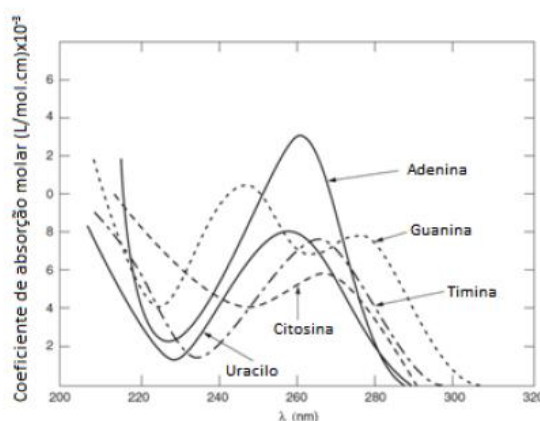


Figura 2.1 - Espectros de absorção das diferentes bases azotadas dos ácidos nucleicos. Adaptado de [15].

Lesões inteligentes em DNA

2 Terapêutica com intercalantes

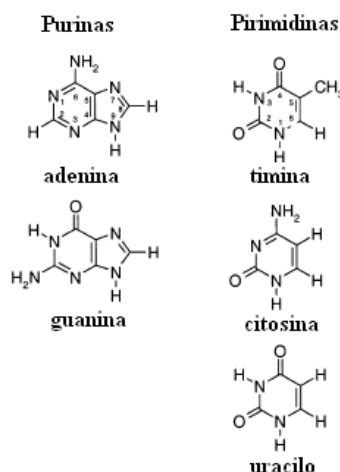


Figura 2.2 – Estrutura química das purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (timina, citosina e uracilo).

Da interacção da radiação ionizante com o DNA distinguem-se dois tipos de efeitos: os indirectos e os directos. O principal efeito indirecto consiste na absorção da energia da radiação ionizante pela água que circunda o DNA (a água representa cerca de 70% da massa celular) e leva à produção dos radicais, H^{\bullet} e e_{aq}^{-} . Devido à sua alta reactividade em relação a qualquer matéria orgânica, o $^{\bullet}OH$ não alcança mais do que cerca de 2 Å antes de ser eliminado por componentes celulares, ou seja, somente aqueles $^{\bullet}OH$ que são criados numa zona muito próxima do DNA é que contribuem para a sua danificação. O efeito directo que consiste na absorção da radiação ionizante pelo DNA, dá origem a um radical do DNA ($DNA^{\bullet+}$) e a um electrão, além de DNA carregado electricamente (DNA^*) [16].

As duas principais lesões induzidas pela radiação UV no DNA são os dímeros de pirimidinas ciclobutano (CPDs) e os fotoprodutos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PPs, aductos de pirimidina) e seus isómeros de valência Dewar. A irradiação por UVB induz principalmente CPDs, enquanto que a irradiação por UVC causa 6-4PPs, o que pode resultar em efeitos mutagénicos mais graves e potencialmente letais [17]. A formação dos CPDs dá-se pelas ligações 5,6 de quaisquer pirimidinas adjacentes; os 6-4PPs são caracterizados por uma ligação estável entre as posições 6 e 4 de duas pirimidinas vizinhas, preferencialmente em sequências 5'-TC e 5'-CC; [18] e a formação dos isómeros de valência Dewar está explicada na figura 2.4. Na figura 2.4, os fotoprodutos formam-se em ligações T-C, C-C e T-C pela acção da luz a 254 nm e 312 nm, sendo que estas lesões ao nível do DNA são tóxicas e mutagénicas.

Lesões inteligentes em DNA

2 Terapêutica com intercalantes

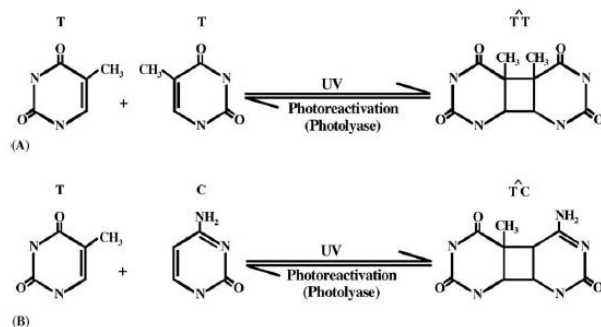


Figura 2.3 - Formação de lesões de DNA induzidas por radiação UV: os dímeros de pirimidina ciclobutano. Os dímeros podem-se formar entre duas pirimidinas adjacentes após a absorção de luz UV. Tem-se (A) Dímeros de pirimidina ciclobutano timina - timina e (B) Dímero timina – citosina [17].

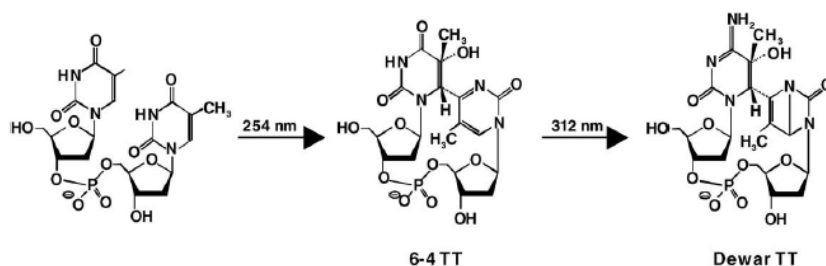


Figura 2.4 - A radiação UV induz a formação de 6-4 fotoprodutos e consequentemente de isómeros de valência de Dewar; estes são formados nas zonas 5'-T-C-3', 5'-C-C-3', 5'-T-T-3' do DNA mas não em 5'-C-T-3'. [17]

Estas duas lesões podem levar a que surjam ainda mais lesões durante a replicação semi-conservativa do DNA, como resultado da inserção de adeninas (A) em locais onde se deveria encontrar outro nucleótido, de acordo com a regra A-T e C-G. Tal facto verifica-se quando a DNA polimerase encontra lesões no DNA que não consegue interpretar, e insere o nucleótido adenina por padrão. Assim, os dímeros citosina - citosina podem dar origem a mutações $C \rightarrow T$ ou $CC \rightarrow TT$ porque a DNA polimerase insere adenina para emparelhar com citosinas, em vez de inserir a guanina. Assim, durante a replicação semi-conservativa do DNA, ocorre a inserção de timinas no DNA recém-sintetizado, e isso pode levar a graves alterações nos organismos [19].

Dados recentes relatam que o UVB é capaz de induzir a formação de 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) no DNA, a qual é uma lesão que pode impedir a transcrição do DNA. No entanto o mecanismo da formação de 8-oxoGua com o DNA celular induzida por UVB permanece incerto. Recentemente, foi sugerido que o radical $OH\cdot$ poderia estar implicado na oxidação da base guanina. Um outro dano que a radiação UVB pode provocar no DNA e que

tem sido alvo de estudo por muitos autores é a formação de *6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine*, também designada por citosina fotohidratada, a qual provém da hidratação de uma citosina no estado excitado. Foi ainda descoberto que o UVC induz, igualmente, a formação deste dano em DNA isolado mas em menor quantidade [20].

2.2 Intercalantes/Fotossensibilizadores

Os intercalantes são moléculas que se inserem perpendicularmente no DNA sem formar ligações covalentes. As únicas forças que mantêm a estabilidade do complexo DNA-intercalante são forças de *Van der Waals* e ligações de hidrogénio [6]. A intercalação destas moléculas leva a perturbações significativas na dupla hélice do DNA, sendo que, ao ocupar espaço entre as bases, irá promover a abertura da dupla hélice. As mudanças na estrutura do DNA podem originar perturbações nas funções biológicas, nomeadamente na replicação, na transcrição e no processo de reparação do DNA [21]. Se estas moléculas intercalantes estiverem presentes no momento da irradiação podem contribuir para o acesso de electrões de solvatação [7]. Por essa razão, os intercalantes poderão ser usados como medicamentos anti-tumorais e anti-sépticos [21].

Os intercalantes podem ainda ter uma acção fotossensibilizadora ao nível das células-alvo tumorais, evitando que as restantes células sofram sua acção tóxica, uma vez que estes não se ligam covalentemente às bases azotadas, purinas e pirimidinas, como os agentes quimio-terapêuticos [7].

Existem três modelos principais para a ligação de um intercalante ao DNA: intercalação, ligação de superfície (*groove binding*) e ligação electrostática (ou externa ou de superfície). A intercalação (fig.2.5 a)) ocorre quando um composto planar heteroaromático se coloca entre os pares de bases do DNA e se liga perpendicularmente ao eixo da hélice. Neste tipo de ligação são as interacções entre as bases e o intercalante que desempenham um papel significativo. A ligação de superfície (fig. 2.5 b)) envolve directamente a formação de pontes de hidrogénio ou interacções de *Van der Waals* com as bases do DNA no sulco principal da hélice do DNA. No terceiro tipo de ligação (fig. 2.5 c)), as interacções electrostáticas entre as espécies catiónicas e o fosfato carregado negativamente presente no DNA ocorrem, normalmente, ao longo do exterior da hélice. A partir desta descrição é evidente que a intercalação e a ligação de superfície estão relacionados com os sulcos da dupla hélice do DNA, enquanto a ligação electrostática pode ter lugar fora do sulco ou na superfície da molécula de DNA. No entanto, a distinção experimental destes tipos de ligação é difícil.

Lesões inteligentes em DNA

2 Terapêutica com intercalantes

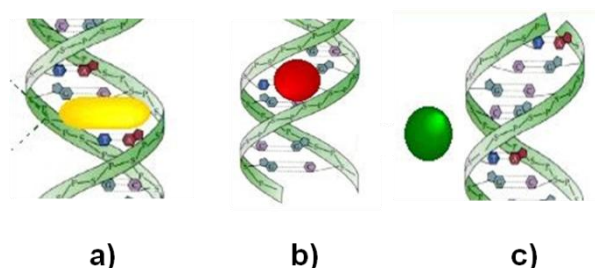


Figura 2.5 - Os três modelos principais para a ligação de um intercalante ao DNA a) Intercalação; b) Ligação de superfície (*Groove binding*) e c) Ligação externa (*External binding*). Adaptado de [22]

Os corantes fenotiazínicos são fotocitotóxicos nos sistemas vivos e podem mesmo causar efeitos mutagénicos fotoinduzidos quando as células são expostas à luz. O DNA é um importante alvo destes corantes fotossensíveis, sendo a guanina, a base que mais danos sofre pela acção dos corantes. Além disso, alguns fotossensibilizadores fenotiazínicos, como o azul de toluidina (TB) e o azul de metileno, têm aplicações promissoras na terapia fotodinâmica para tratamento de tumores. Estes corantes com potencial capacidade anti-tumoral podem eliminar as células tumorais através de reacções directas ou indirectas com o DNA [23].

No âmbito deste trabalho iremos apenas abordar um dos fotossensibilizadores mencionados anteriormente, isto é, o azul de metileno, especificando a forma como este é activado fotoquimicamente. O azul de metileno é um corante fenotiazínico que interage com os ácidos nucleicos, proteínas e lípidos e induz reacções químicas após fotoactivação. Este provoca a formação de oxigénio no seu estado singuleto, causando danos em sistemas biológicos, incluindo a quebra da dupla cadeia de DNA [24].

A fotoquímica básica do azul de metileno, representada na figura 2.6, foi estudada em diversos sistemas químicos, o que permitiu entender a acção deste na maioria dos sistemas biológicos. Verifica-se, então, que um feixe de luz pode excitar o MB do estado fundamental para um estado singuleto excitado (^1MB), o qual tem aproximadamente igual probabilidade de voltar ao estado fundamental ou para um estado tripleto excitado (^3MB). O MB em estado de tripleto excitado pode decair muito lentamente de volta ao estado fundamental ou reagir por reacções do tipo I ou II. Importa referir que as reacções do tipo I correspondem à transferência de electrões e remoção de hidrogénios, conduzindo à produção de radicais livre e que as reacções do tipo II ocorrem, rapidamente, na presença de oxigénio e produzem oxigénio no estado singuleto e MB no seu estado fundamental [25].

Lesões inteligentes em DNA

2 Terapêutica com intercalantes

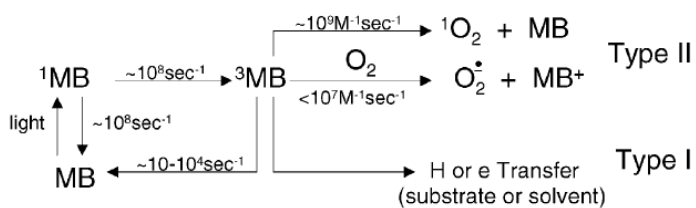


Figura 2.6 - Esquema da fotoquímica básica de azul de metileno. O MB é activado para o estado singlete (^1MB) pela luz. ^1MB pode decair com igual probabilidade de volta ao estado fundamental ou para um estado de tripleto (^3MB). O ^3MB pode reagir conforme reacções do tipo II (reagindo com o oxigénio para formar oxigénio no estado singlete ($^1\text{O}_2$) e MB estado fundamental) ou, alternativamente, em um processo muito mais lento para formar superóxido e MB. Alternativamente, o ^3MB também pode reagir de acordo com reacções do tipo I (Reacções com átomos de hidrogénio ou por processos de transferência de electrões).[16]

Lesões inteligentes em DNA

2 Terapêutica com intercalantes

3 Descrição do método experimental

Neste capítulo é feita a descrição dos métodos experimentais e metodologias usadas no desenvolvimento deste trabalho, bem como do processo de preparação dos filmes finos de DNA e azul metileno pela técnica de derramamento, e por fim é descrita a preparação das soluções de DNA, MB e das bases constituintes do DNA.

3.1 Técnicas de caracterização das amostras

Os métodos espectroscópicos fornecem informação acerca da interação da radiação electromagnética com a matéria, nomeadamente aquando das transições entre os níveis de energia de átomos ou moléculas, as quais ocorrem por absorção de luz da região do UV e visível, e também sobre o seu efeito sobre os modos vibracionais e rotacionais que ocorrem por acção da radiação da zona do infravermelho.

3.1.1 Espectrofotometria de UV-Vis

A técnica de espectrofotometria de UV-Vis permite analisar as transições electrónicas que podem ocorrer em sistemas poliatómicos, pois a radiação UV e a luz visível têm energia suficiente para transferir os electrões das orbitais ligantes para orbitais anti-ligantes, criando assim um estado electrónico excitado. A dissipação dessa energia absorvida pode ocorrer através de uma modificações químicas, de emissão de luz ou apenas por emissão de calor [26].

Nas moléculas, os electrões que formam ligações químicas simples são designados por electrões σ , enquanto os responsáveis pelas ligações duplas são chamados de electrões π . Em sistemas que contenham ligações duplas, os electrões π predominam e determinam os estados de energia dos electrões de valência, os quais são excitados por absorção de radiação visível ou UV. Existem ainda os electrões não-ligantes que são designados por electrões n . [27]

A caracterização espectroscópica das bases de DNA é feita com base nos tipos de transições electrónicas responsáveis pelo espectro. Assim, existem três grandes grupos de transições electrónicas, em que o primeiro engloba as transições de uma orbital no estado fundamental para outra de maior energia, isto é, transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $\sigma \rightarrow \sigma^*$. O segundo grupo corresponde a transições de uma orbital atómica não-ligante para uma orbital molecular de maior energia, isto é, transições $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$. Por fim, o terceiro grupo inclui as transições de uma orbital no estado fundamental para outra de maior energia na direcção da ionização da molécula e que se designam por orbitais de Rydberg. Todas estas transições estão associadas à absorção de energia de determinadas regiões do espectro electromagnético, sucintamente representadas na Tabela 3.1 [27].

Tabela 3.1 - Resumo das transições electrónicas associadas a regiões do espectro electrónico.

Transições	Região do espectro electromagnético
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	Ultravioleta do Vácuo
$\pi \rightarrow \pi^*$	Ultravioleta
$n \rightarrow \pi^*$	Ultravioleta Próximo
$n \rightarrow \sigma^*$	Ultravioleta Longínquo

Para o estudo da cinética das soluções irradiadas com UV foi usado o espectrofotómetro THERMO Scientific, EVOLUTION 300 UV-VIS, existente no REQUIMTE, DQ, FCT-UNL. O espectrofotómetro usado é de feixe duplo com porta-amostras de caminho óptimo de 10 mm, possui um detector ligado a uma placa de aquisição e encontra-se esquematizado na figura 3.1. Para medir a absorvância das soluções aquosas a estudar, foram utilizadas células de quartzo com tampa (totalmente transmissíveis aos comprimentos de ondas considerados anteriormente), tendo sido usada como referência uma célula com água ultra-pura Mili-Q, uma vez que é o solvente de todas as soluções preparadas.

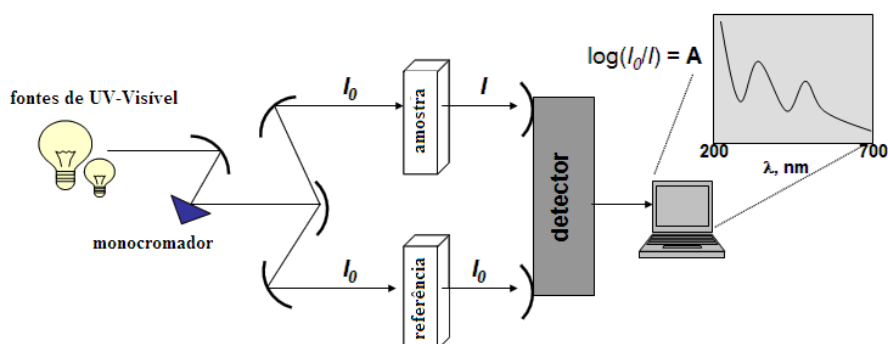


Figura 3.1 - Representação esquemática de um espectrofotômetro de UV-Vis.

3.1.2 Espectrofotometria de Infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica instrumental simples e rápida que pode evidenciar a presença de vários grupos funcionais, tendo a vantagem da não destruição da amostra, precisão de resultados, simplicidade e rapidez de leitura [28]. Esta técnica mede a excitação vibracional, provocada pela radiação infravermelha, dos átomos em torno das ligações covalentes que estes fazem entre si e entre grupos de átomos. A posição das linhas de absorção depende dos grupos funcionais presentes e o espectro obtido é único para cada substância. É de salientar que os grupos funcionais têm comprimentos de onda específicos e assinaturas características [26]. A energia da radiação cujo comprimento de onda corresponde ao infravermelho é apenas suficiente para provocar transições entre os níveis de energia vibracionais, permanecendo a molécula no seu estado fundamental. Estas transições entre os níveis vibracionais acontecem porque há alterações do momento dipolar devido à variação da distribuição electrónica em torno das ligações [28], existindo, portanto, dois tipos de vibrações moleculares [7]:

- Estiramento: Movimento rítmico ao longo do eixo da ligação de forma que a distância interatômica aumenta ou diminui, podendo ser simétrico ou assimétrico. (Fig. 3.2)

Lesões inteligentes em DNA

3 Descrição do método experimental

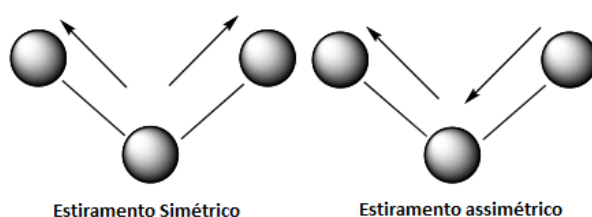


Figura 3.2 - Vibração por estiramento: simétrico e assimétrico.

- **Deformação:** Mudança do ângulo de ligação entre ligações com o átomo comum ou movimento de um grupo de átomos em relação a uma parte da molécula. Existem quatro modos de vibração: Tesoura, *Twist*, Rotação e *Wag*, tal como se pode observar na figura 3.3.

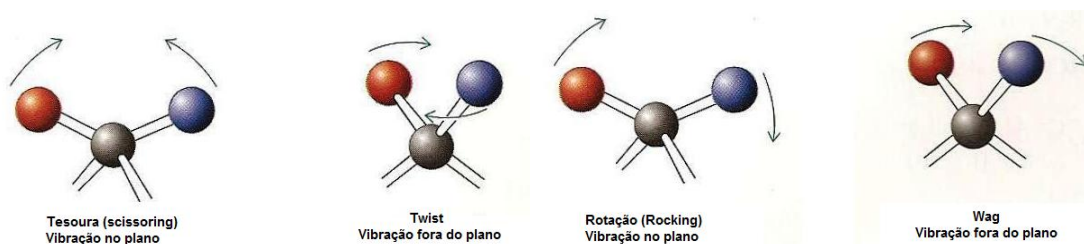


Figura 3.3 - Representação esquemática dos quatro modos de vibração por deformação: Tesoura, *Twist*, Rotação e *Wag*. Adaptado de [26].

Com o intuito de estudar o efeito da radiação UV nos filmes de DNA e DNA+MB, procedeu-se à análise de espectroscopia de infravermelho, FT-IR, tendo sido utilizado um espectrómetro Perkin Elmes Spectrometer Spectrum 100, um modelo de feixe simples existente no REQUIMTE, DQ, FCT-UNL.

É ainda de referir que, os espectros FT-IR obtidos foram de algum modo influenciados pelas más condições do espectrofotómetro utilizado e pelas condições atmosféricas laboratoriais, nomeadamente a humidade do ar e temperatura.

3.2 Fonte de irradiação

O estudo do efeito da radiação nos filmes de DNA e de azul de metileno produzidos foi realizado recorrendo a uma lâmpada de UV. A fonte de irradiação UV usada neste trabalho foi uma lâmpada UVC germicida (TUV PL-S 5W/2P 1CT) de descarga de vapor de mercúrio a baixa pressão, em que apenas 1,1 W são convertidos em potência UV. Esta lâmpada emite radiação UV maioritariamente nos 253,7 nm que corresponde a uma zona de UVC. Neste comprimento de onda é obtido aproximadamente 85% do efeito germicida máximo. A emissão de radiação nesta gama de comprimentos de onda induz a produção de ozono, que é tóxico e muito reactivo, sendo essa a razão pela qual a lâmpada possui um vidro que filtra a linha a 185 nm do mercúrio.

Esta lâmpada encontra-se dentro do aparelho usado para irradiação que foi projectado e montado no âmbito dos projectos acerca do estudo do efeito da radiação UV na matéria biológica na linha 4 de Sistemas Moleculares e Funcionais do CEFITEC [29]. Este aparelho possui um exaustor para a remoção do ozono, bem como um sistema de segurança que não permite ter a lâmpada acesa com a porta do aparelho aberta, não havendo a possibilidade do operador ser exposto à radiação UV. Uma vez que o forte efeito germicida induzido pela radiação UVC pode provocar temporariamente conjuntivites (inflamações na membrana da mucosa do olho) e eritemas (vermelhidões na pele), é necessário ter muito cuidado no seu uso. Como já foi referido, não existe o perigo do operador ser exposto à radiação UV, contudo é preciso ter atenção durante o manuseamento do aparelho [29].

Tendo em conta que quando a matéria (por exemplo os microrganismos ou moléculas) é exposta à radiação UV é sujeita a uma dose de radiação, D (W.s/m^2), que corresponde ao fluxo de radiação (Irradiância), I , multiplicada pelo tempo de exposição, t (s), de acordo com a equação 1:

$$D = I \cdot t \quad (1)$$

A Irradiância como a medida que traduz a energia média por unidade de área e por unidade de tempo, expressa em W/m^2 . Geometricamente, como é exibido na figura 3.4, a Irradiância numa pequena superfície num ponto “P”, a uma distância “a” de uma fonte de radiação, linear e ideal de comprimento “l” é dada pela equação 2:

$$I = \frac{\varphi}{2\pi^2 \cdot l \cdot a} (2\alpha + \operatorname{sen} 2\alpha) \quad (2)$$

Em que φ corresponde à potência UVC da lâmpada (W) e o valor de α , em radianos, é dado pela seguinte equação 3: [29]

$$\alpha = \arctg\left(\frac{l}{2 \cdot a}\right) \quad (3)$$

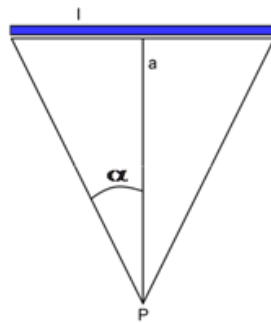


Figura 3.4 - Descrição matemática da Irradiância para uma fonte de radiação ideal e linear.

Para as irradiações efectuadas, a distância da fonte ao fotodetector e, consequentemente, à amostra foi aproximadamente 3 cm, fazendo com que a irradiância seja aproximadamente 42,219 W/m², já que a lâmpada tem um comprimento de 13,4 cm.

É de salientar que algumas irradiações de filmes finos foram feitas com uma lâmpada TUV PL-L 55W (4P HF 1CT, com 53,5 cm de comprimento), sendo que apenas 19,25 W são convertidos em potência UV. Para esta fonte de radiação, a distância da fonte ao detector foi aproximadamente 15 cm, de forma que a irradiância fosse próxima do valor de irradiância usada anteriormente (36,125 W/m²).

3.3 Métodos de preparação das amostras

Aqui iremos descrever como foram preparadas as diversas amostras e quais os compostos e materiais usados.

3.3.1 Azul de metileno

O azul de metileno (CAS 7220-79-3) é um composto aromático heterocíclico com uma estrutura planar e está representado na figura 3.5. O máximo de comprimento de onda de luz que este composto absorve é a 662 nm e o seu coeficiente de absorção molar, de acordo com a lei de Lambert-Beer, é de $19 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 254 nm [30]. A massa molar do composto é de 373,9g/mol e foi adquirido à empresa Sigma Aldrich [31]. Quando o azul de metileno está numa solução aquosa, apresenta uma cor azul muito intensa, sendo por isso muito usado como corante biológico e indicador ácido-base.

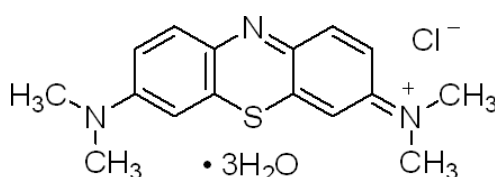


Figura 3.5 - Representação esquemática da estrutura química do azul de metileno.

Foi feito um estudo para cálculo do coeficiente de extinção molar, com soluções de diferentes concentrações de azul de metileno e obtenção dos respectivos espectros, como se verifica na figura 3.6.

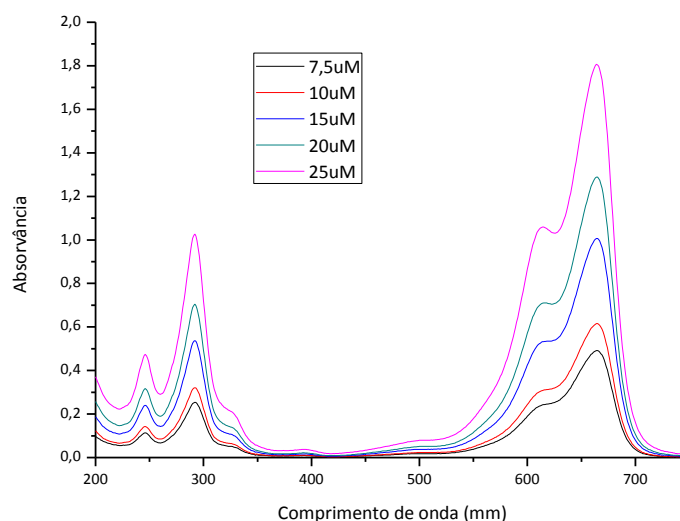


Figura 3.6 - Espectros UV-Vis de soluções de azul de metileno com diferentes concentrações para o estudo do coeficiente de absorção molar.

Na figura 3.7 encontram-se as representações gráficas dos valores de absorvância em função da concentração nos quatro comprimentos de onda indicados, a partir dos quais é possível determinar os valores do coeficiente de extinção usando a lei de Lambert- Beer:

$$Abs = \epsilon dC \quad (4)$$

sendo Abs a absorvância a um determinado comprimento de onda, ϵ o coeficiente de absorção, d a espessura da *cuvette* e C a concentração da solução. Os coeficientes de absorção foram calculados a partir dos declives obtidos para as quatro rectas na forma da equação 4, e tendo em conta que a espessura da *cuvette* é de 1 cm, os resultados do coeficiente de absorção encontram-se indicados na Tabela 3.2.

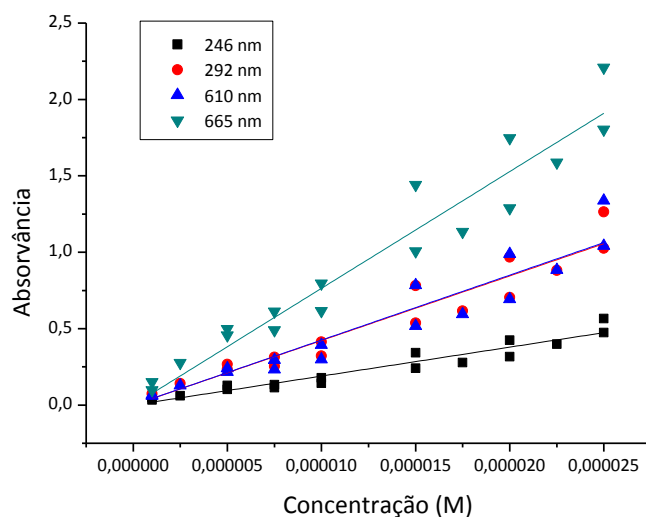


Figura 3.7 - Representação das absorvâncias a diferentes comprimentos de onda: 246 nm, 292 nm, 610 nm e 665 nm, em função da concentração de azul de metileno. As linhas contínuas representam as rectas de ajuste aos pontos experimentais. Valores obtidos experimentalmente e complementados com os valores obtidos em [7].

Tabela 3.2 - Parâmetros obtidos através das rectas de calibração das diferentes soluções de MB para os comprimentos de onda de 246 nm, 292 nm, 610 nm e 665 nm, onde ϵ o coeficiente de absorção no comprimento de onda e R o coeficiente de correlação

Comprimento de onda	Declive (dm ³ /mol)	ϵ (cm ² /mol)	ϵ (m ² /mol)	R
246 nm	19000±700	190000±7000	19,0±0,7	0,977
292 nm	42000±2000	420000±20000	42±2	0,976
610 nm	43000±2000	430000±20000	43±2	0,967
665 nm	76000±3000	760000±30000	76±3	0,979

Estes resultados estão de acordo com a literatura, tendo em conta os valores obtidos por Banat *et al.* [30], o coeficiente de absorção molar a 254 nm é de 19 m²/mol, e para os 664 nm é de 76 m²/mol obtidos por Hossain *et al.* [32]. Comparando com a tabela 3.2 tem-se que a 246 nm, o coeficiente é de 19±0,7 m²/mol e a 665 nm é de 76±3 m²/mol.

Tendo em conta as incertezas dos gráficos de absorção calculados em cerca de 5%, esta será a incerteza que se associa às concentrações das soluções preparadas no âmbito deste trabalho.

3.3.2 DNA

O ácido desoxirribonucleico utilizado ao longo deste trabalho encontrava-se disponível hidrofiliado e na forma de sal de sódio (*DNA sodium salt from calf thymus lyophilized*, CAS 73049-39-5) e foi adquirido à empresa Sigma Aldrich. Possuindo o ião sódio como contra-íão, a sua dissolução em água é facilitada permitindo a preparação de soluções aquosas de DNA de carácter aniónico. A estrutura molecular do DNA encontra-se representada na figura 3.8 [31], e é constituído por grupos fosfato, pentoses e bases.

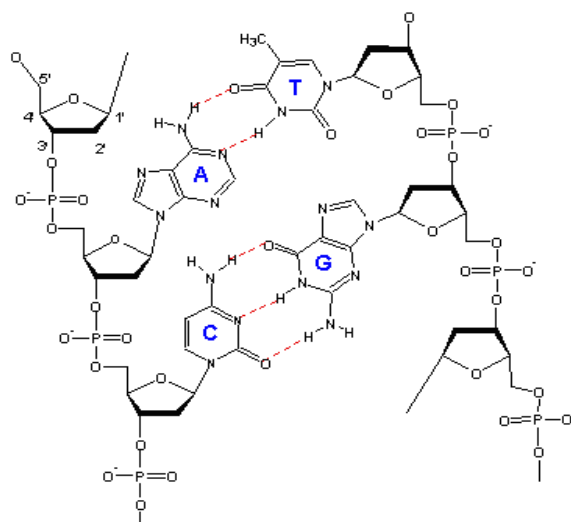


Figura 3.8 - Representação esquemática da molécula de DNA.

3.3.3 Bases do DNA

Neste trabalho vamos estudar o efeito da radiação UV nas bases do DNA isoladas, ou seja, sem a presença do grupo fosfato e da pentose. Estas bases dividem-se em dois grupos, as pirimidinas e as purinas, que diferem entre si por terem um ou dois anéis na sua estrutura, respectivamente. As purinas são a adenina e a guanina, enquanto as pirimidinas englobam a citosina e a timina.

A adenina usada foi adquirida à Sigma (CAS 73-24-5), com um mínimo de pureza de 99%. A sua estrutura molecular encontra-se representada na figura 3.9 e a sua massa molar é de 135,13 g/mol.

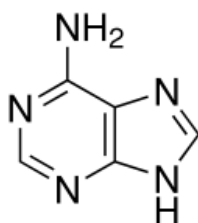


Figura 3.9 - Representação esquemática da estrutura da molécula de adenina.

A guanina foi adquirida à Sigma (CAS 73-40-5), com um mínimo de pureza de 99%. A sua estrutura molecular encontra-se representada na figura 3.10 e a sua massa molar é de 151,13 g/mol.

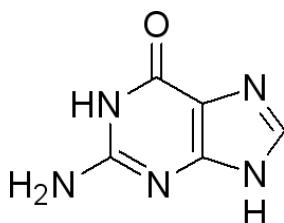


Figura 3.10 - Representação esquemática da estrutura da molécula de guanina.

A timina foi, igualmente, adquirida à Sigma (CAS 65-71-4), com um mínimo de pureza de 99%. A massa molar da timina é de 126, 11 g/mol. Na figura 3.11 encontra-se a representação esquemática da estrutura molecular da timina.

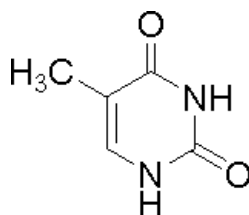


Figura 3.11 – Representação esquemática da estrutura da molécula de timina.

Por fim, a citosina foi também adquirida à Sigma (CAS 71-30-7) e tem um mínimo de pureza de 99%. A sua massa molar é de 111,11 g/mol. Na figura 3.12 encontra-se a representação esquemática da estrutura molecular da citosina.

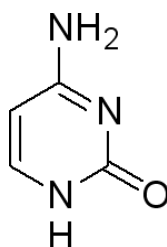


Figura 3.12- Representação esquemática da estrutura da molécula de citosina.

3.3.4 Lavagem e armazenamento de substratos

Foram usados substratos de fluoreto de cálcio (CaF_2) para a produção de filmes por derramamento, uma vez que o fluoreto de cálcio é transparente ao infravermelho na região de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} (espectroscopia de infravermelho). Para uma correcta lavagem dos substratos efectuaram-se os seguintes procedimentos:

- Lavagem em detergente de uso comum;
- Lavagem com uma solução metanol/acetona/clorofórmio para remover vestígios de DNA e possíveis gorduras;
- Imersão durante 5 minutos numa solução de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ na proporção de 4:1, sendo esta solução denominada de solução piranha, uma vez que elimina todos os resíduos orgânicos contidos nos substratos, hidrolisando também a superfície dos mesmos;
- Imersão e lavagem com água ultra pura Mili-Q;
- Secagem com fluxo de azoto gasoso.

É de salientar que a solução piranha é corrosiva e resulta de uma reacção exotérmica, devendo ser preparada na *hotte* e com técnicas de seguranças adequadas, tais como o uso de uma solução neutralizante caso ocorra derrame do ácido ou da solução final. Como a reacção é exotérmica é necessário deixar a solução arrefecer antes de imergir os substratos, de forma a evitar a sua fragmentação.

3.3.5 Preparação de filmes finos pela técnica de derramamento

A técnica de derramamento consiste em derramar em cima de um substrato a solução da molécula ou moléculas em estudo e colocar dentro de um exsiccador com sílica gel, durante um período de 24 horas para que o solvente da solução, neste caso a água, evapore. Desta forma garante-se que a amostra está seca na altura da obtenção dos espectros.

A concentração de DNA usada para os filmes de derramamento foi $62,5\text{ mg/mL}$ e a de azul de metileno foi 10 mM .

3.3.6 Preparação das soluções em estudo, de DNA, de DNA com azul metileno e das bases

As soluções de DNA e de DNA+MB foram preparadas dissolvendo o soluto em água ultra pura por um sistema *Milipore*, que produz água padrão do tipo mili Q que apresenta uma resistividade de 18,4 M Ω . Estas soluções para serem irradiadas em *cuvettes* de quartzo com tampa, tiveram que ser colocadas em 3 banhos de ultra-sons de 5 minutos, de forma a garantir que se obtinham soluções homogêneas.

As soluções que continham as bases de DNA isoladas não precisaram de banhos de ultra-sons, uma vez que apresentam boa solubilidade em água.

Lesões inteligentes em DNA

3 Descrição do método experimental

4 Caracterização por FT-IR

Neste capítulo serão apresentados os estudos realizados acerca do efeito da radiação UV em filmes finos de DNA e de DNA+MB produzidos pela técnica de derramamento e analisados pela espectrofotometria de infravermelho. Com o objectivo de se verificar qual é a contribuição da presença de moléculas de água, estes filmes foram irradiados na presença e na ausência de água.

4.1 Irradiação por UV de amostras secas de DNA e de DNA com MB

As figuras 4.1 a) e b) mostram os espectros de infravermelho de filmes obtidos por derramamento de uma solução de DNA e de uma solução de DNA+MB sobre substratos de CaF_2 , irradiados com luz UV de comprimento de onda 254 nm (UVC) durante diferentes intervalos de tempo, respectivamente.

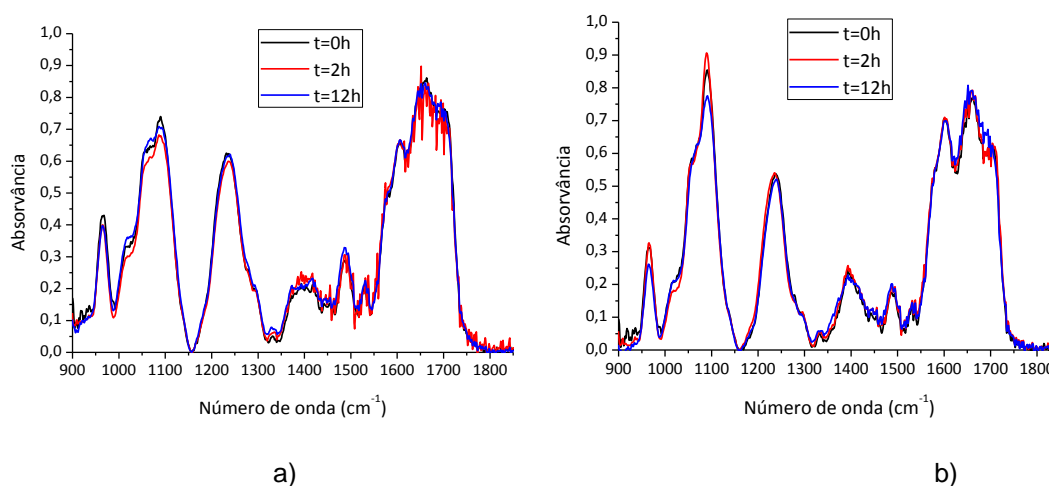


Figura 4.1 - Espectros de absorvância de filmes de a) DNA e de b) DNA+MB produzidos por derramamento e irradiados com luz UV por 2 e 10 horas.

A figura 4.1 a) representa os espectros de DNA em diferentes condições de medição, e estão de acordo com o obtido por Gomes *et al* [33], verificando-se algumas diferenças nos espectros após a irradiação com luz UV. No entanto, para uma melhor análise dos espectros e

das diferenças observadas, procedeu-se ao tratamento dos espectros, nomeadamente à remoção da linha de base e à normalização para o pico a 1018 cm^{-1} , correspondente às vibrações das ligações da furanose no DNA, que de acordo com Gomes *et al* [33] não sofre alterações com a exposição à radiação UV. Para uma melhor análise destes espectros foram listadas na tabela 4.1 as diversas assinaturas espectrais compiladas da mistura de azul de metileno e DNA. [33-36]

Tabela 4.1 - Números de onda e respectivas assinaturas espectrais de azul de metileno e ácido desoxirribonucleico por análise de infravermelho [33-36].

Número de onda (cm^{-1})	Número de onda (cm^{-1}) - Literatura	Assinatura
964	950-970	Estiramento da ligação CC do esqueleto (DNA)
1016	1010-1020 990	Vibrações das ligações da furanose (DNA) Vibrações de flexão C-H (fora do plano) (MB)
1053	1044-1069 1038	Estiramento da ligação CO no esqueleto (DNA) Vibrações de flexão C-H (no plano) (MB)
1092	1085-1090	Estiramento simétrico das ligações PO_2^- (DNA)
1142	1143	Estiramento N- CH_3 (MB)
1178	1178 1183	Estiramento N- CH_3 (MB) Ligação açúcar/fosfato na forma A (DNA)
1217	1225-1220 1215-1230	Estiramento assimétrico da ligação PO_2^- na forma-B (DNA) Estiramento da ligação C=S no anel aromático (MB)
1248	1247 1235-1245	Estiramento N- CH_3 (MB) Estiramento assimétrico da ligação PO_2^- na forma-A (DNA)
1280	1281 1275	Vibrações da ligação $\text{C}_5=\text{C}_6$ da citidina Torção da ligação CN_3H da timidina (DNA)
1297	1285-1297	Estiramento da ligação C_4NH_2 da citosina (DNA)
1334	1333	Estiramento da ligação $\text{C}_{\text{Aromatico}}-\text{N}$ (MB)
1356	1344	Vibração da ligação $\text{N}_7\text{C}_8\text{H}$ de dA in C2'-endo/anti (DNA)
1392	1369-1381 1374-1389 1388	Citidina e guanosina em anti-conformação (DNA) Estiramento simétrico com deformação da ligação CH_3 da timidina Estiramentos múltiplos no anel C=N (MB)
1418	1420-1425	Extremidade C_3' da desoxirribose na forma-A (DNA) Extremidade C_3' da desoxirribose na forma-Z (DNA)
1446	1453-1457	Adenina na forma A ou B (DNA)

Lesões inteligentes em DNA

4 Caracterização por FT-IR

	1434-1438	Adenina na forma Z (DNA)
1489	1476-1495	Vibrações do anel das adeninas e guaninas (DNA)
		Torção da ligação N_7C_8H da adenina e guanina (DNA)
	1488	Estiramento $C=C$ no anel lateral (MB)
1531	1520-1527	Vibrações no plano do anel de citosina de cadeia simples ou dupla
	1530	Vibrações das ligações C no plano (DNA)
1575	1575-1590	Vibrações da ligação $C=N$ do anel da guanina em cadeia simples ou dupla (DNA)
	1585	
1600	1601	Vibrações da ligação $C=N$ do anel da guanina (DNA)
	1600	Estiramento do anel central na ligação $C=N$ (MB)
1657	1655-1657	Estiramento da ligação $C_2=O_2$ da citosina de cadeia simples ou dupla
1703	1691-1698	Estiramento da ligação $C_2=O_2$ da timina de cadeia simples ou dupla
1715	1715	Estiramento da ligação $C_2=O_2$ da guanina em forma de Hoogsteen da terceira cadeia (DNA)
	1712	Estiramento da ligação $C_2=O_2$ da timina em forma de Hoogsteen da terceira cadeia (DNA)

Para uma melhor análise destes espectros procedeu-se ao cálculo de rácios de intensidade normalizada de alguns picos importantes em função do tempo de irradiação, para os dois tipos de espectros mostrados nas figuras 4.1 a) e b).

Nomeadamente nas figuras 4.2 a) e b) encontram-se representados rácios referentes aos picos a 966 cm^{-1} que corresponde ao estiramento da ligação CC do esqueleto do DNA; 1018 cm^{-1} que representa as ligações da furanose; 1053 cm^{-1} que é a ligação CO dos açúcares, e por fim o pico a 1088 cm^{-1} que corresponde às ligações do grupo fosfato.

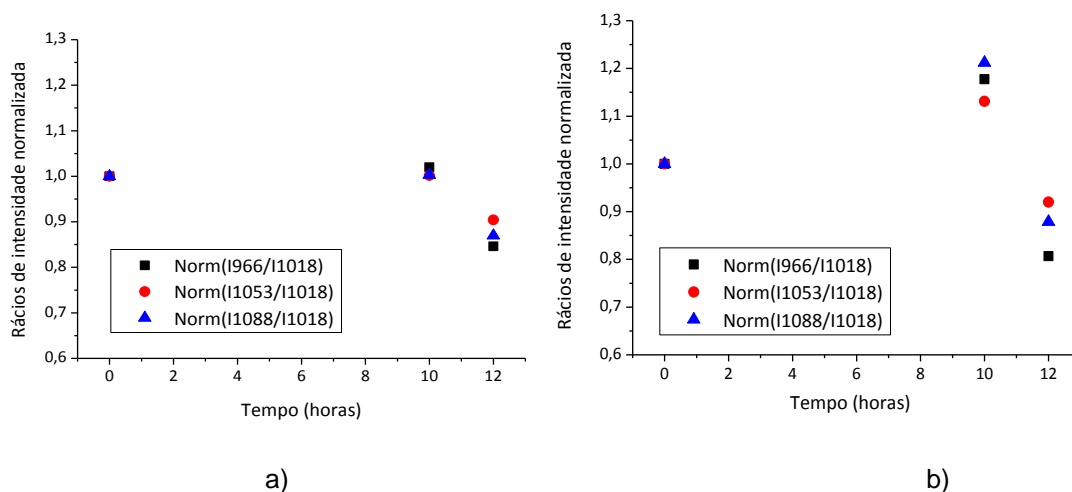


Figura 4.2 - Rátios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 966 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} e 1088 cm^{-1} relativamente ao pico 1018 cm^{-1} de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB irradiada por luz UV em diferentes intervalos de tempo.

Pela análise dos rácios da figura 4.2, verifica-se que os três picos seguem o mesmo comportamento, isto é, são aproximadamente constantes nas primeiras horas de irradiação e decrescem após as 10 horas. Partindo deste facto, pode-se inferir que ocorre a diminuição do estiramento das ligações CC e CO dos açúcares (966 cm^{-1} e 1053 cm^{-1}), e que os grupos fosfato (1088 cm^{-1}) presentes no DNA também sofrem uma diminuição do estiramento entre as suas ligações. Os rácios relativos à solução de DNA e MB apresentam um comportamento semelhante aos da solução de DNA. Contudo, é visível um aumento mais acentuado dos rácios na presença do intercalante, facto que seria necessário e interessante aprofundar recorrendo a outras técnicas e amostras com diferentes concentrações quer de DNA quer de MB.

Na figura 4.3 a) e b) estão representados os picos a 1238 cm^{-1} que corresponde ao estiramento simétrico dos fosfatos na forma-A do DNA; a 1487 cm^{-1} que representa as vibrações do anel e a torção da ligação $\text{N}_7\text{C}_8\text{H}$ das adeninas e guaninas, e por fim o pico a 1600 cm^{-1} que corresponde às vibrações da ligação $\text{C}=\text{N}$ do anel da guanina.

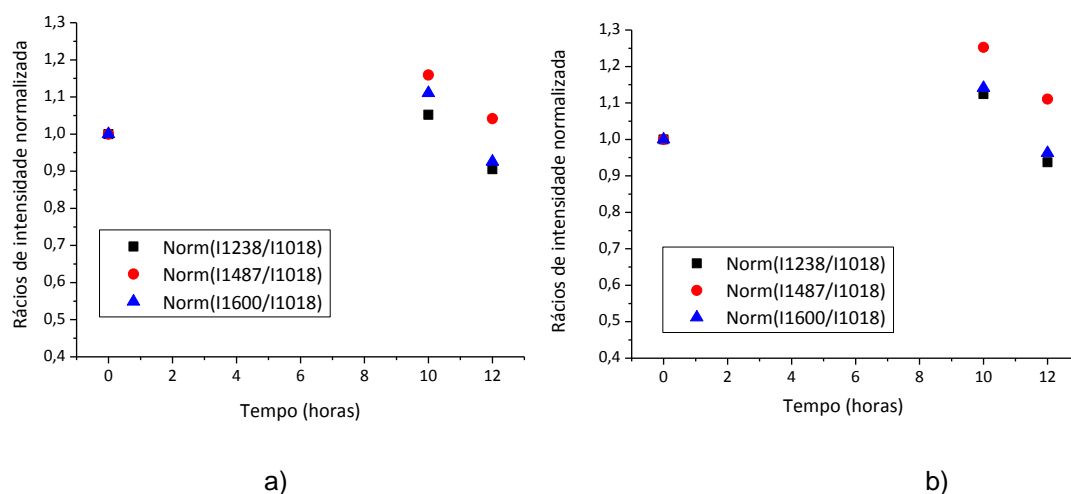


Figura 4.3 - Rátios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 1238 cm^{-1} , 1487 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} relativamente ao pico 1018 cm^{-1} de amostras de a) DNA e b) DNA e MB irradiados por luz UV por diferentes intervalos de tempo.

O rácio referente ao pico a 1238 cm^{-1} segue o mesmo comportamento que os analisados anteriormente, ou seja, após as 10 horas tende ocorrer uma diminuição do estiramento assimétrico da ligação fosfato. No entanto, o pico a 1487 cm^{-1} tende a aumentar de intensidade com o tempo de irradiação e só decresce ao fim das 10 horas. Desta forma, não é possível afirmar se ocorrem ou não as vibrações ao nível do anel das adeninas e guaninas, bem como a torção da ligação $\text{N}_7\text{C}_8\text{H}$ das mesmas. Relativamente ao pico a 1600 cm^{-1} , não se verifica uma diminuição significativa que nos permita concluir que ocorra alguma acção da radiação UV na ligação $\text{C}=\text{N}$ do anel da guanina. Tal como para os picos anteriores, estes têm o mesmo comportamento que os picos referentes aos filmes de DNA, contudo apresentam um aumento ligeiramente mais acentuado. Estes resultados já tinham sido observados por Coelho [7] e mostram, portanto, que a presença do MB pode desempenhar um papel de protector da radiação.

4.2 Irradiação por UV de amostras na presença de água

Tendo em conta que o meio celular é constituído maioritariamente por água, foi adicionada água às amostras e, de modo a que as amostras de DNA e de DNA+MB sejam irradiados na presença de água. Uma vez que se espera que a água adicionada provoque a produção de radicais livres pela interacção da luz UV, tal como foi referido no capítulo 2. Esses radicais livres irão, por sua vez, interagir com o DNA, provocando a ruptura de ligações e outras reacções químicas. No entanto, deve-se salientar que nesta experiencia a água evapora

durante a exposição à radiação e portanto o volume de água não é constante durante a irradiação.

Na figura 4.4 encontram-se representados os espectros das amostras de DNA e de DNA e MB da figura 4.1, agora irradiadas com luz UV durante 10 e 30 horas na presença de água, depositada sobre a superfície destas amostras. É de salientar que no momento da aquisição dos espectros as amostras encontravam-se secas.

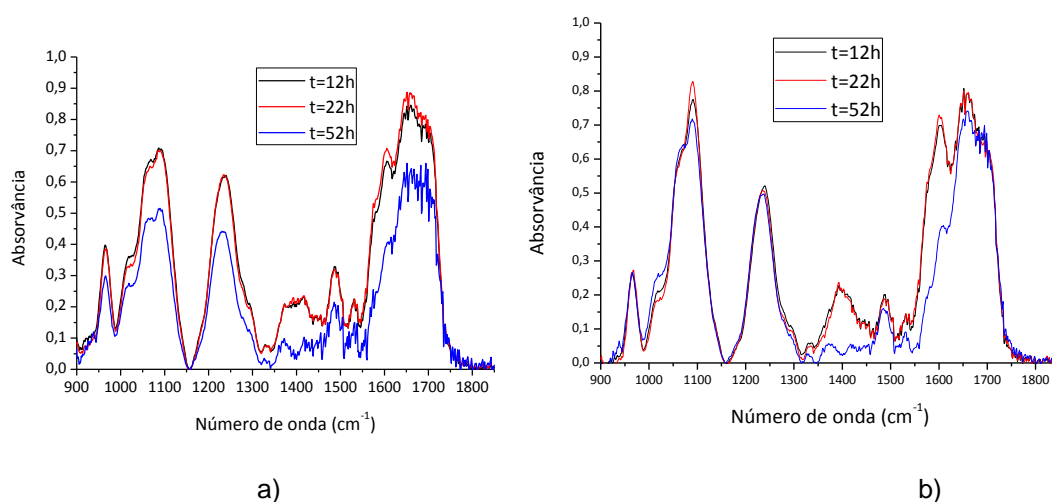


Figura 4.4 - Espectros de absorvância de um filme de a) DNA e de b) DNA e MB produzidos por derramamento e irradiados com luz UV por mais 10 e 30 horas na presença de água.

Como se pode constatar, verificam-se diferenças significativas nos espectros quando a água foi depositada sobre as amostras e após uma exposição prolongada ao UV. Tal como para os espectros anteriores, procedeu-se ao seu tratamento e cálculo de rácios de intensidade em função do tempo de irradiação. Nas figuras 4.5 a) e b) encontram-se representados rácios referentes aos picos a 966 cm^{-1} que corresponde ao estiramento da ligação CC do esqueleto; 1018 cm^{-1} que representa as ligações da furanose; 1053 cm^{-1} que é a ligação CO dos açúcares, e por fim o picos a 1088 cm^{-1} que corresponde às ligações dos grupos fosfatos.

Lesões inteligentes em DNA

4 Caracterização por FT-IR

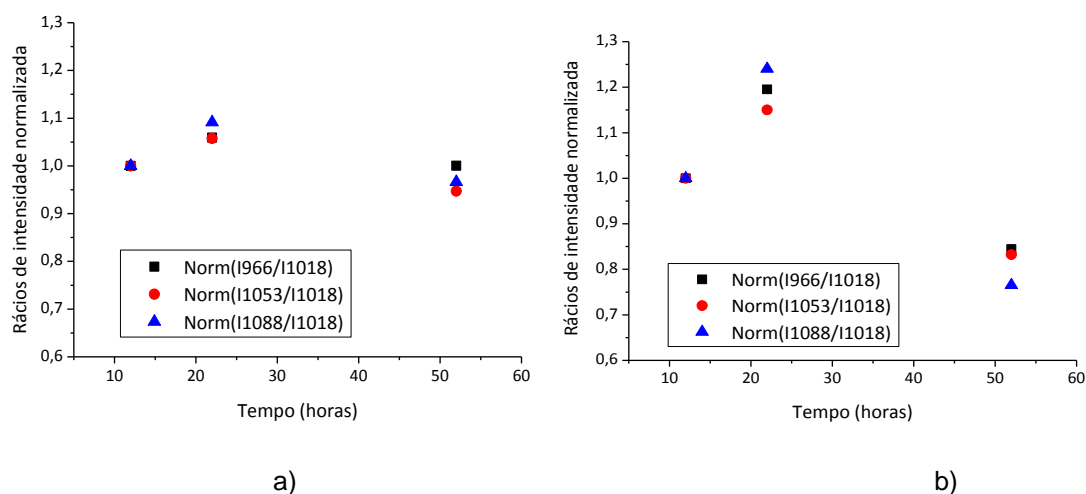


Figura 4.5 - Rátios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 966 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} e 1088 cm^{-1} relativamente ao pico 1018 cm^{-1} de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB irradiado por luz UV em diferentes intervalos de tempo.

Para a análise destes rácios é preciso ter em conta os rácios da figura 4.2, tendo-se verificado que após 10 horas de irradiação, os rácios tinham tendência a decrescer. Contudo, nos rácios da figura 4.5 não se verifica essa tendência, uma vez que após as 12 horas de exposição estes voltam a aumentar. Assim, não é possível comprovar o efeito da adição de água num filme fino de DNA, sendo então necessário realizar mais experiências com base em soluções aquosas e posterior preparação de filmes finos.

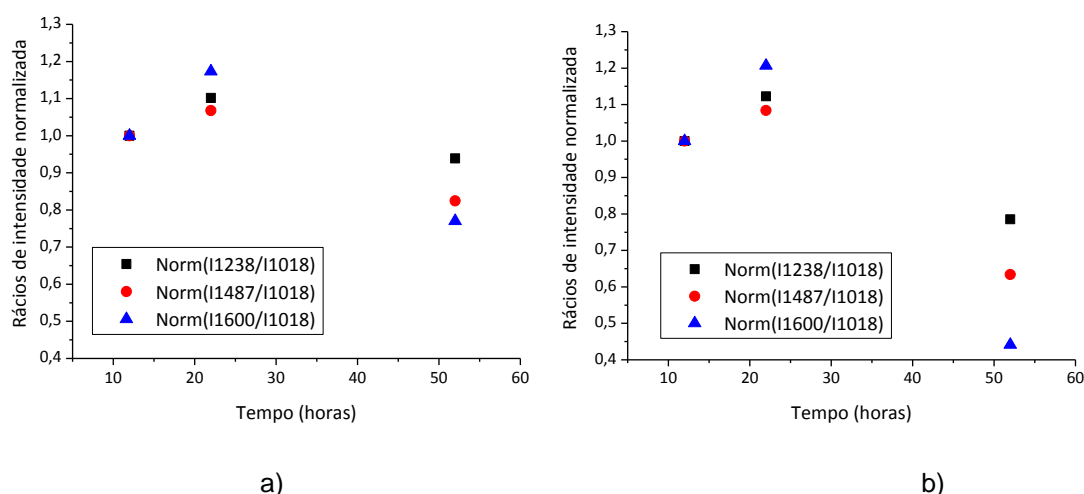


Figura 4.6 - Rátios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 1238 cm^{-1} , 1487 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} relativamente ao pico 1018 cm^{-1} de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB irradiado por luz UV em diferentes intervalos de tempo.

Lesões inteligentes em DNA

4 Caracterização por FT-IR

Na figura 4.6 a) e b) estão representados os picos a 1238 cm^{-1} que correspondem ao estiramento simétrico dos fosfatos na forma-A do DNA; a 1487 cm^{-1} que representam as vibrações do anel e a torção da ligação $\text{N}_7\text{C}_8\text{H}$ das adeninas e guaninas, e por fim o pico a 1600 cm^{-1} que corresponde às vibrações da ligação $\text{C}=\text{N}$ do anel da guanina.

Tal como nos rácios anteriores, é necessário ter em conta os rácios das figuras 4.3 a) e b) e a sua análise. Como se verifica na figura 4.6 a) e b), os rácios voltam a aumentar com o tempo de irradiação, não se podendo tirar conclusões acerca do que ocorre nas ligações em análise.

No entanto, na presença do intercalante, as diferenças encontradas são mais significativas, como se pode verificar na figura 4.6 b).

Ao analisar os rácios como um todo, tanto os da amostra de DNA como os da amostra de DNA+MB verifica-se uma tendência de decréscimo dos rácios ao longo do tempo, o que nos pode indicar que ocorreu a diminuição do número relativo das ligações após a adição de água ao filme fino.

É possível observar que na presença do intercalante esse decréscimo é ligeiramente superior ao que ocorre quando este não está presente. Contudo, para uma melhor compreensão destes resultados, foi necessário proceder à preparação de novas amostras e estudar o efeito da radiação sendo o procedimento similar desde o início, ou seja que fossem sempre secos durante a exposição à radiação UV.

Assim, após a preparação dos filmes, as amostras com água depositada sobre a preparação foram irradiadas com luz UV em diferentes intervalos de tempo, nomeadamente, de 10 e 20 horas, de forma a estudar a sua cinética de irradiação. Deve-se aqui salientar que durante este período de tempo, a água colocada sobre os filmes também ia evaporando. Na figura 4.7, podem observar-se os espectros de um filme de DNA, e na figura 4.8 os espectros de um filme de DNA e MB, aos quais já foi retirada a linha de base e normalizados aos picos 1090 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} , respectivamente.

Lesões inteligentes em DNA

4 Caracterização por FT-IR

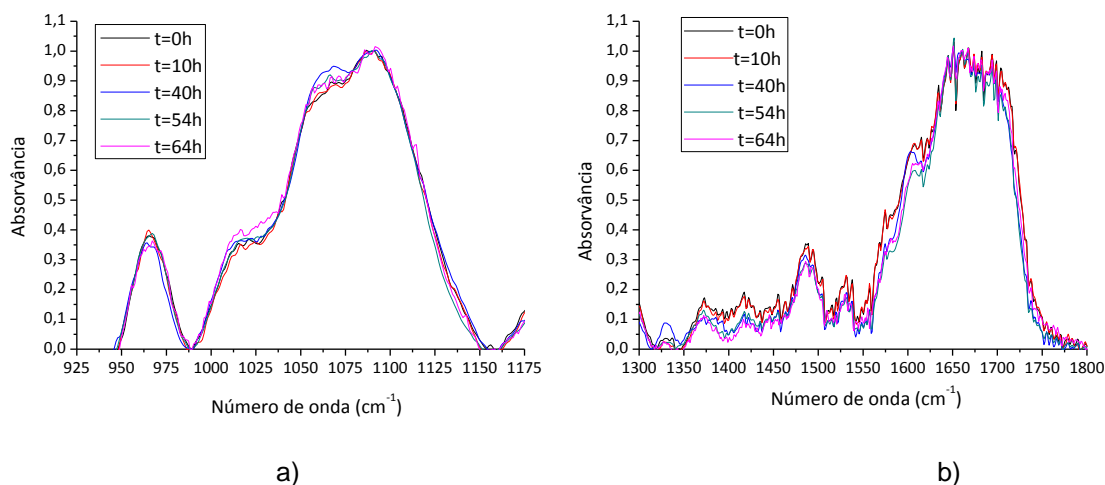


Figura 4.7 - Espectros de absorvância de um filme de DNA de a) 950 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} normalizado a 1090 cm^{-1} , e b) de 1300 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} normalizado a 1660 cm^{-1} produzido por derramamento e irradiado com luz UV na presença de água.

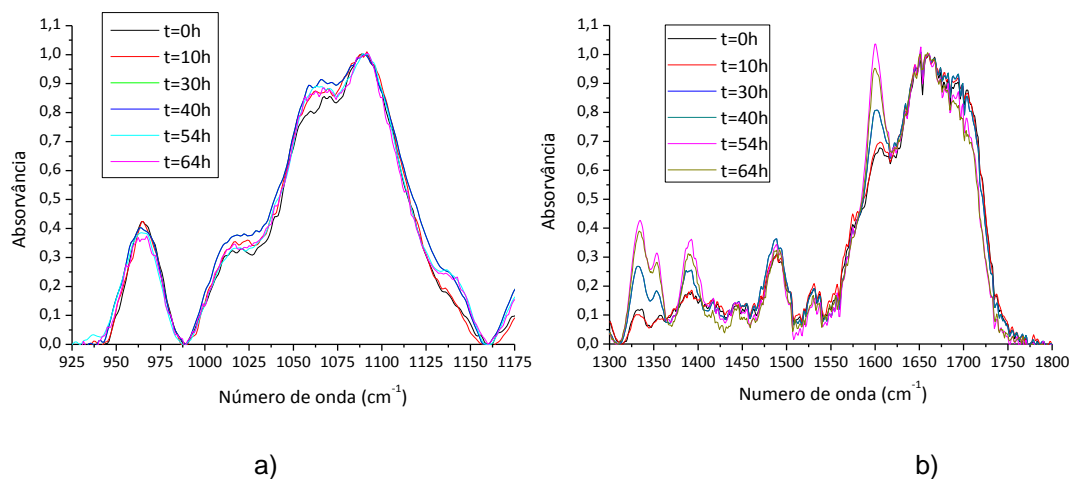


Figura 4.8 - Espectros de absorvância de um filme de DNA e MB de a) 950 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} normalizado a 1090 cm^{-1} , e b) de 1300 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} normalizado a 1660 cm^{-1} , produzido por derramamento e irradiado com luz UV na presença de água

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos, procedeu-se ao cálculo de rácios de intensidade normalizada entre os picos 1014 cm^{-1} (ligações da furanose) e 1067 cm^{-1} (ligação CO dos açúcares), relativamente ao pico 1090 cm^{-1} (às ligações do grupo fosfato) para o intervalo de número de onda de 900 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} , sendo que o pico 1090 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico das ligações PO_2^- (DNA).

Na figura 4.9 estão representados graficamente os rácios de intensidade de absorvância das bandas associadas às ligações da furanose (1014 cm^{-1}) e à ligação CO no esqueleto (1067 cm^{-1}) em função do tempo de irradiação.

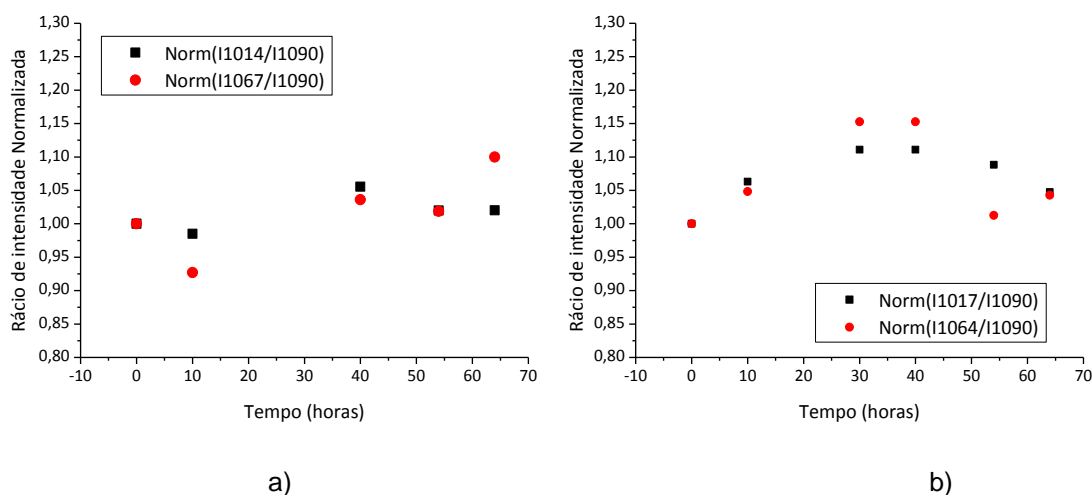


Figura 4.9 - Rácios das intensidades normalizadas de picos de infravermelho 1014 cm^{-1} e 1067 cm^{-1} , relativamente ao pico de 1090 cm^{-1} de uma amostra de um filme de derramamento de a) DNA e b) DNA e MB, e irradiado com radiação UV de 254 nm em diferentes intervalos de tempo.

A figura 4.9 a) revela um ligeiro aumento dos rácios, o que permite concluir que as ligações da furanose (1014 cm^{-1}) não sofrem grandes alterações ao longo do tempo de irradiação, ou seja, são independentes do tempo de exposição. Também não se verifica a quebra da ligação CO no esqueleto do DNA (1067 cm^{-1}).

Observa-se, no entanto, na figura 4.9 b) um aumento dos rácios até às 30 horas de irradiação e depois um ligeiro decréscimo. Como o pico a 1090 cm^{-1} corresponde às ligações PO_2^- do DNA e este tende a diminuir com o tempo, verifica-se a quebra das mesmas. Assim, pode-se inferir que os picos a 1017 cm^{-1} e 1064 cm^{-1} são constantes até as 30 horas e que a partir desse ponto ocorrem as vibrações das ligações da furanose (1017 cm^{-1}) e o estiramento da ligação CO no esqueleto do DNA (1064 cm^{-1}).

Efectuou-se a mesma análise para o intervalo de número de onda de 1300 cm^{-1} a 1850 cm^{-1} , calculando os rácios de intensidade normalizada entre os picos 1489 cm^{-1} referentes ao anel das adeninas e guaninas e ligação $\text{N}_7\text{C}_8\text{H}$ da adenina e guanina, 1531 cm^{-1} (ligações C no plano do DNA) e 1607 cm^{-1} (ligação $\text{C}=\text{N}$ do anel da guanina) relativamente ao pico 1660 cm^{-1} que corresponde à ligação $\text{C}_2=\text{O}_2$ da citosina de cadeia simples ou dupla e que não sofre alterações com a luz UV, de acordo com Gomes et al. [33]

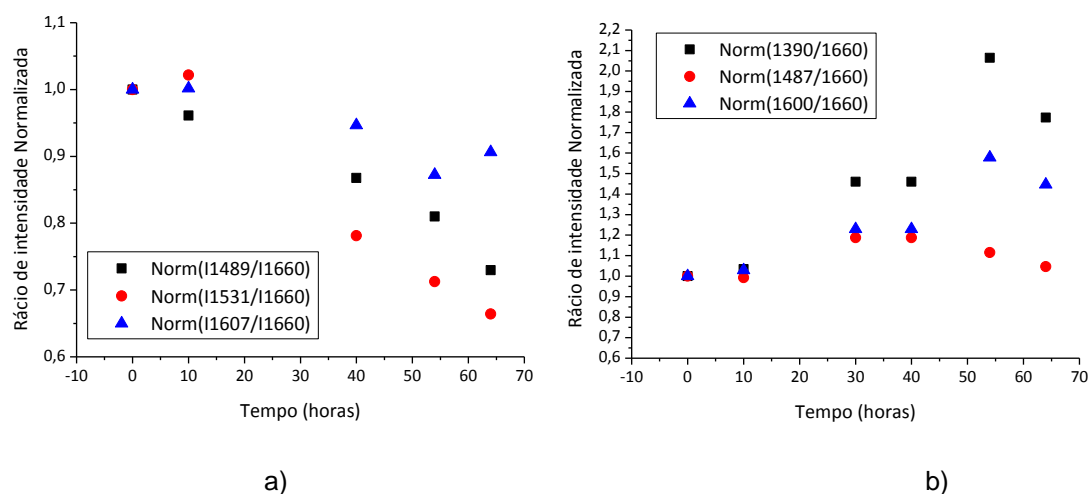


Figura 4.10 - Rácios das intensidades normalizadas de picos de infravermelho 1489 cm^{-1} , 1531 cm^{-1} e 1607 cm^{-1} relativamente ao pico de 1660 cm^{-1} de uma amostra de um filme por derramamento de a) DNA e b) DNA e MB, e irradiado com radiação UV de 254 nm em diferentes períodos de tempos.

De acordo com os dados da figura 4.10 a), observa-se um decréscimo em todos os rácios e pode-se inferir que ocorreu a diminuição das vibrações do anel das adeninas e guaninas, bem como das vibrações de torção da ligação $\text{N}_7\text{C}_8\text{H}$ das mesmas. Estes resultados indicam que estas duas bases são destruídas pela luz UV ao longo do tempo. Relativamente à guanina, ainda se verificou a diminuição da vibração da ligação $\text{C}=\text{N}$ do seu anel. Quanto à estrutura do DNA como um todo, também ocorreram vibrações das ligações CC , o que demonstra que a luz UV provoca alguma instabilidade no DNA.

Em relação às amostras de DNA com o intercalante (fig.4.10 b)), o pico a 1660 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação $\text{C}_2=\text{O}_2$ da citosina de cadeia simples ou dupla. Os restantes picos referem-se ao estiramento simétrico com deformação da ligação CH_3 da timidina (1390 cm^{-1}), às vibrações do anel das adeninas e guaninas, bem como à torção da ligação $\text{N}_7\text{C}_8\text{H}$ da adenina e guanina. Analisou-se o pico referente ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ no anel lateral (1487 cm^{-1}), que aumenta como os anteriores mas tende a decrescer, indicando que poderá ocorrer o estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$. Relativamente aos rácios do pico a 1390 cm^{-1} , este aumenta o que pode inferir que existe um aumento do número de ligações $\text{C}-\text{H}$. Todos os outros rácios estudados aumentam com o tempo de irradiação, não sendo possível concluir acerca do que ocorre nesses picos, nem de que reacções químicas estão a acontecer.

4.3 Irradiação de soluções para posterior preparação de filmes finos por derramamento

A água tem uma enorme influência na acção destruidora quer da luz UV, quer da acção do intercalante azul de metileno. Como tal, tendo por base os resultados anteriores, foram preparadas soluções de DNA e de DNA com MB, as quais foram irradiadas com luz UV em diferentes intervalos de tempo, com a posterior preparação de filmes finos. É de salientar que nesta experiência as amostras são independentes e, que portanto, pode haver uma maior dispersão de dados.

Na realização desta experiência irradiou-se soluções cuja concentração de DNA foi de 25 g/L e a concentração de DNA foi de 10 mM. Estas foram colocadas a irradiar em *cuvettes* de quartzo fechadas, de modo a não ocorrerem trocas de matéria com o meio exterior, já que estas poderiam levar à alteração da concentração das soluções e, consequentemente, induziriam em dispersão de resultados.

Após a irradiação das soluções e preparação dos filmes finos, obtiveram-se os espectros FT-IR, aos quais foram retiradas as linhas de base e normalizados para o pico a 1240 cm^{-1} , tal como se verifica na figura 4.11.

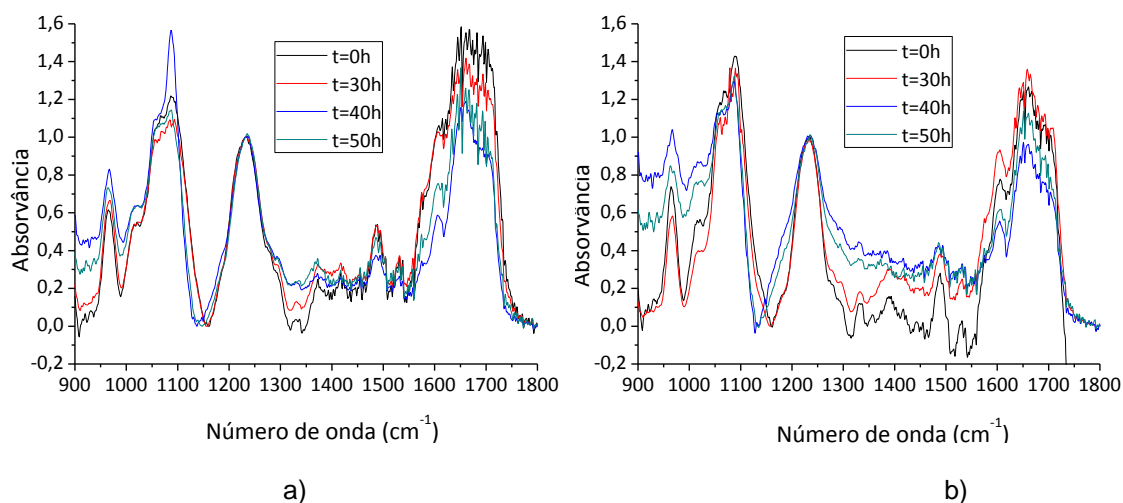


Figura 4.11 - Espectros de absorvância de filmes de a) DNA e b) DNA+MB produzidos por derramamento e irradiado com luz UV normalizados a 1240 cm^{-1} .

Nos espectros das figuras 4.11 a) observam-se alterações significativas na intensidade dos picos, principalmente após 40 e 50 horas de irradiação. Este facto leva a crer que na presença de água existe uma maior degradação e desnaturação do DNA. E o mesmo se

verifica na presença do intercalante, como se constata na figura 4.11 b). Para compreender melhor o que aconteceu, analisamos alguns rácios de picos.

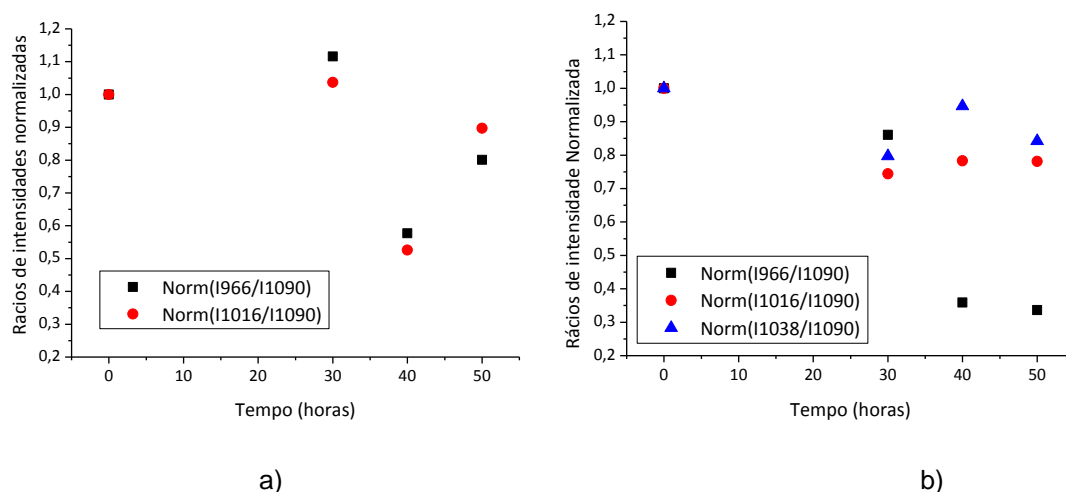


Figura 4.12 - Rácios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 966 cm^{-1} e 1016 cm^{-1} relativamente ao pico 1090 cm^{-1} de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB cuja solução foi previamente irradiada em diferentes intervalos de tempo.

O pico a 1090 cm^{-1} corresponde ao estiramento das ligações PO_2^- existentes no DNA, sendo que após a acção da luz UV ocorre a sua quebra, e por isso a intensidade deste pico tende a diminuir. Comparando com a intensidade do pico a 966 cm^{-1} , que equivale à ligação C-C dos açúcares do DNA, verifica-se que o seu rácio diminui ligeiramente (fig.4.12 a)). O mesmo ocorre para o pico relacionado com as ligações da furanose a 1016 cm^{-1} , o qual também diminui, indicando a quebra destas ligações.

Como se pode observar na figura 4.12 b), os rácios estudados diminuem com o tempo de irradiação, mas não na mesma proporção que os da figura 4.12 a). No pico a 966 cm^{-1} , referente à ligação CC do esqueleto, verifica-se que este teve um decréscimo muito acentuado, cerca de 70%, o que indica que houve quebra total da ligação. Já o pico a 1016 cm^{-1} não sofreu alterações significativas, apenas diminuiu ligeiramente o seu valor ao longo do tempo, indicando uma pequena vibração das ligações da furanose. Relativamente ao pico a 1038 cm^{-1} , que corresponde à ligação C-H do MB, este apresentou um decréscimo muito ligeiro, revelando um ligeiro aumento da vibração da ligação em causa. Este facto sugere-nos que o MB não foi muito afectado pela acção da luz UV.

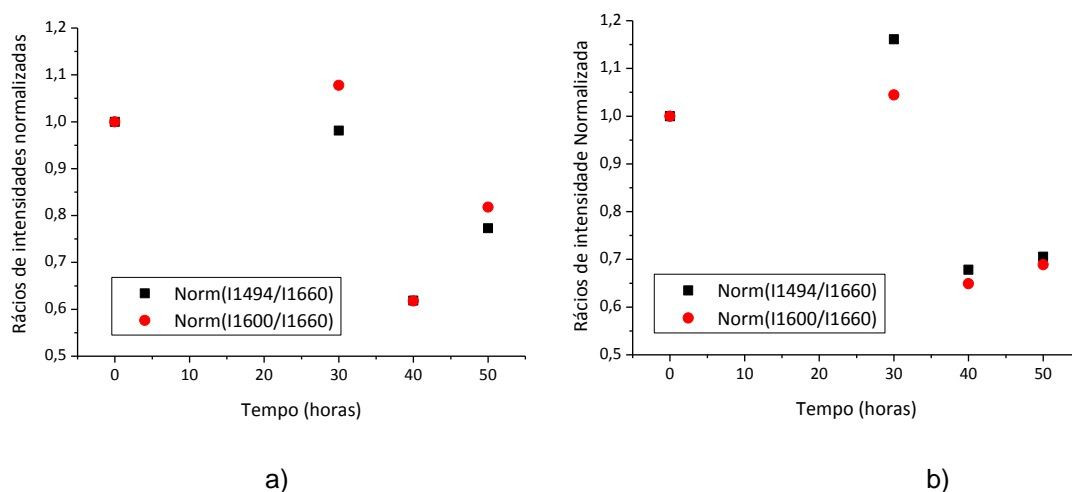


Figura 4.13 - Rátios de intensidades normalizadas dos picos de IV a 1494 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹ relativamente ao pico 1660 cm⁻¹ de uma amostra de um filme fino de a) DNA e b) DNA e MB cuja solução foi previamente irradiada em diferentes intervalos de tempo.

Pela figura 4.13 a) observa-se que os rácios têm tendência a decrescer com o aumento do tempo de irradiação. O pico a 1660 cm⁻¹ corresponde à ligação C₂=O₂ da citosina, logo poderá ocorrer a sua quebra para ligações simples, diminuindo assim a sua intensidade. Partindo deste ponto, conclui-se que ocorrem vibrações no anel das bases adenina e guanina, torção da ligação N₇C₈H das mesmas (pico a 1494 cm⁻¹), e ainda vibrações da ligação C=N do anel da guanina.

Na figura 4.13 b), constata-se que os rácios de intensidade de absorvância diminuíram com o tempo de irradiação, aproximadamente na mesma proporção registada na solução de DNA sem a presença do intercalante, provocando poucas lesões nas duas bases implícitas nestes picos.

Tendo por base os dados obtidos e a análise efectuada, conclui-se que a medição referente às 30 horas de irradiação deveria ter sido repetida, uma vez que esta não segue o mesmo comportamento que as outras medições. Pode-se também concluir que o DNA sofreu a acção da luz UV, tendo sido as suas bases o alvo principal da sua acção.

4.4 Conclusões

Neste capítulo procedeu-se à caracterização por espectrofotometria de infravermelho de filmes finos de DNA e de DNA+MB produzidos por derramamento e irradiados com UV em

Lesões inteligentes em DNA

4 Caracterização por FT-IR

diferentes condições. Nos primeiros filmes produzidos por derramamento e irradiados, os resultados são um pouco discordantes e controversos, mas demonstram que se registam alterações moleculares e que as intensidades de absorvâncias das principais ligações tendem a decrescer com o tempo de exposição, indicando a diminuição destas ligações.

Os filmes que desde o início foram irradiados na presença de água demonstraram que a presença da água provoca alguns danos no DNA, nomeadamente na diminuição das vibrações do anel das adeninas e guaninas, da torção da ligação N_7C_8H das mesmas, bem como das vibrações na ligação $C=N$ do anel da guanina, indicando a quebra destas ligações. Na estrutura do DNA verificou-se uma diminuição das vibrações das ligações CC do seu esqueleto. Pode-se assim concluir que a presença de água é importante para a degradação do DNA. No entanto não foi possível inferir acerca da acção do intercalante MB e da água, uma vez que se verificou o aumento dos rácios analisados.

Para uma melhor compreensão da acção da presença de moléculas de água, irradiou-se as soluções de DNA e de DNA+MB antes da preparação dos filmes a caracterizar por infravermelho. Pela análise dos espectros das soluções de DNA e de DNA e MB, pode-se concluir que existe uma maior degradação do DNA após um longo intervalo de tempo de exposição à radiação UV e que a presença do intercalante tem pouca influência na acção da luz UV no DNA.

Lesões inteligentes em DNA

4 Caracterização por FT-IR

5 Caracterização por UV-Vis

Neste capítulo serão apresentados os estudos do efeito da radiação UV em soluções de DNA na presença e na ausência de azul de metileno e nas bases que compõem o DNA, a guanina, timina, citosina e adenina. A caracterização dos danos causados pela luz UV será feita na região do UV-vis e com base nas suas bandas características. Pretende-se ainda observar qual o efeito do intercalante azul de metileno após acção da luz ultravioleta no DNA e nas bases.

5.1 Efeito da radiação UV no azul de metileno

Pretende-se analisar o efeito da presença do intercalante azul de metileno quando exposto à radiação ultravioleta, por diferentes intervalos de tempo. Para tal preparou-se uma solução de MB com concentração de 10 μM . Esta concentração foi escolhida tendo em conta que apresenta valores de absorvância em regiões UV-Vis que permitem a monitorização das mudanças de absorvância causadas pela radiação. Esta solução foi colocada a irradiar numa *cuvette* fechada durante diferentes intervalos de tempo e o efeito da radiação ultravioleta no azul metileno foi caracterizado medindo-se os espectros UV-Vis em função do tempo de irradiação, tal como mostra a figura 5.1. Nesta figura observa-se um decréscimo no valor da absorvância nas principais bandas características do azul de metileno.

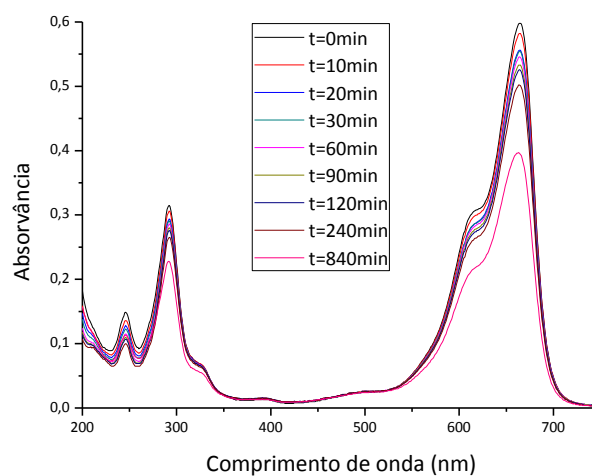


Figura 5.1 - Espectros de absorvância de UV-Vis de uma solução de MB de concentração 10 µM após diversos intervalos de tempo de irradiação por UV.

Como se pode observar pelo espectro obtido, o azul de metileno exibe duas grandes bandas de absorção a 293 nm e a 663 nm. Estas duas bandas correspondem a duas transições electrónicas, uma transição $\pi - \pi^*$ e outra transição $n - \pi^*$, respectivamente. Observa-se também a banda a 610 nm que corresponde à transição vibrónica 0-1, e uma banda aos 246 nm que corresponde a uma transição $\pi - \pi^*$ [37]. As bandas e respectivas transições encontram-se listadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Bandas características do azul de metileno e respectivas transições electrónicas e vibracionais. [37]

	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4
$\lambda(\text{nm})$	246	293	610	663
Transição	$\pi - \pi^*$	$\pi - \pi^*$	0-1	$n - \pi^*$

Para uma melhor análise do espectro, as intensidades das bandas a 246 nm, 292 nm, 610 nm e 665 nm foram representadas graficamente em função do tempo de irradiação.

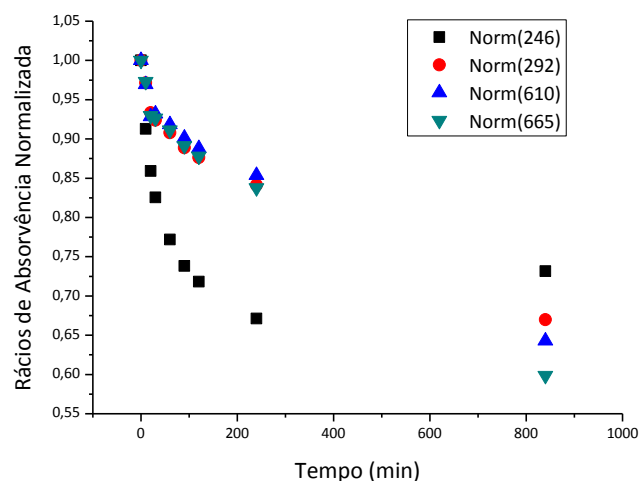


Figura 5.2 - Variação da intensidade de absorvância das bandas características do intercalante azul de metileno no tempo. Os valores estão normalizados ao valor inicial.

Na Figura 5.2 verifica-se que à medida que a amostra é irradiada, existe uma diminuição da intensidade das várias bandas, o que se podia observar na amostra pela diminuição da intensidade da cor azul característica deste intercalante ao longo do tempo, tendo a descoloração sido total ao fim das 14 horas de irradiação. Estes factores levam a concluir que o azul de metileno é degradado pela acção da luz UV, quando presente numa solução aquosa, o que é corroborado por Ong *et al* [38] e Tayade *et al* [39]. Estes autores verificaram que o azul de metileno sofre uma descoloração e uma degradação fotocatalítica na presença de luz UV. A descoloração que ocorre é maior quanto menor a concentração do intercalante, uma vez que assim existe uma maior probabilidade de todas as moléculas absorverem o UV, ocorrendo degradação e consequente descoloração. Segundo aqueles autores, a descoloração é total ao fim de 6 horas de irradiação.

Apesar de existir uma diminuição de intensidade das bandas ao longo do tempo, o mesmo não se sucede com a banda a 246 nm, uma vez que se verifica um aumento da intensidade após 250 minutos de irradiação. Este facto é descrito na literatura como produto de uma acumulação de compostos aromáticos da degradação do intercalante [38].

Relativamente ao tempo de decaimento estimado para esta amostra é de 600 ± 100 minutos para o pico a 246 nm, e cerca de 2000 minutos, ou seja, 33,3 horas para os restantes picos. Estes valores estão tabelados na tabela 5.3.

5.2 Efeito da radiação UV em soluções de DNA e de DNA+MB

Para o estudo do efeito da radiação UV em soluções de DNA e de DNA+MB, prepararam-se soluções de DNA e de DNA+MB. A concentração de DNA usada foi de 0,05 mg/mL e a de MB foi de 10 μ M. Estas soluções foram colocadas a irradiar por diferentes intervalos de tempo em *cuvettes* fechadas e bem isoladas para não existirem trocas com meio exterior. Os espectros de UV-Vis foram medidos para diferentes tempos de irradiação e encontram-se representados na figura 5.3 a) e b) para uma solução de DNA e para uma solução de DNA+MB, respectivamente.

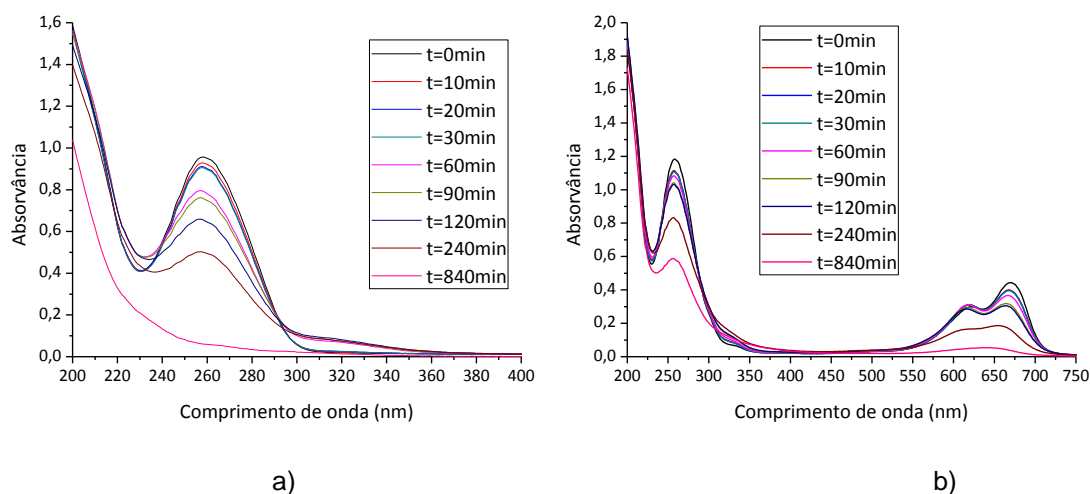


Figura 5.3 - Espectros de absorvância de UV-Vis de uma solução de a) DNA e de b) DNA com azul de metileno, após ter sido irradiada por luz UV por diversos períodos de tempo.

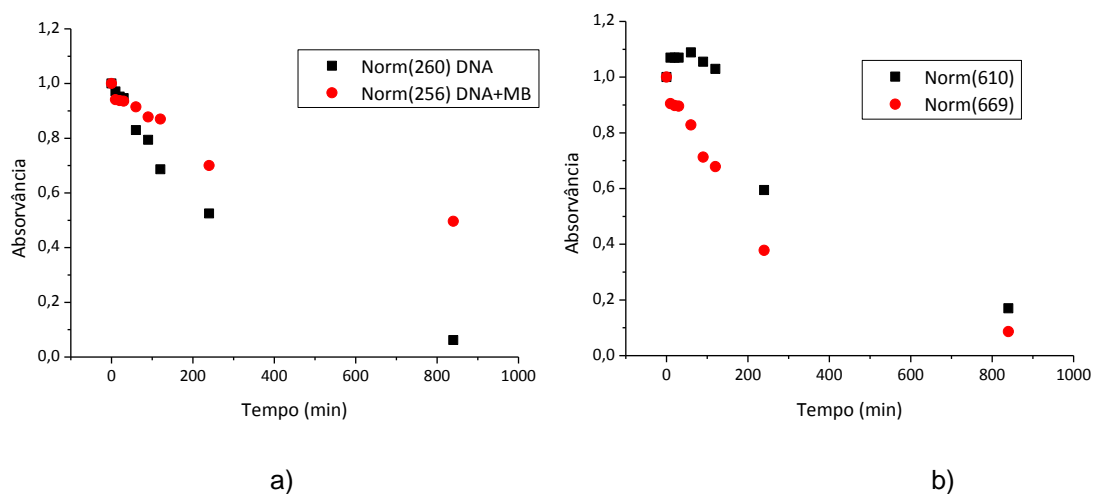
No espectro da figura 5.3 a) observa-se duas bandas distintas a 200 nm e a 260 nm. A banda a 260 nm é a banda característica do DNA e é atribuída às bases. Enquanto a banda a 200 nm, apesar de cortada pelo limite do espectro, pode ser atribuída à banda da adenina e da água. Esta banda está também relacionada com as transições electrónicas da guanina de $n \rightarrow \pi^*$, e da timina de $\pi \rightarrow \pi^*$. Na tabela seguinte estão listadas as bandas e respectivas transições.

Tabela 5.2 – Bandas características de um espectro de UV-Vis de DNA. [33]

	Banda 1	Banda 2
$\lambda(\text{nm})$	200	260
Transições	Guanina: $n \rightarrow \pi^*$ Timina: $\pi \rightarrow \pi^*$	Todas as bases

De acordo com as figuras 5.3 a) e b), verifica-se uma diminuição na intensidade de absorvância nas bandas a 260 nm das duas soluções, sendo essa banda característica do DNA e está também relacionada com a absorção das bases. É igualmente visível um decréscimo nas bandas a 610 nm e 665 nm características do MB (fig.5.3.b). Esta diminuição deve-se à interacção entre as duas moléculas e é dependente da concentração de DNA ([DNA]) e MB ([MB]). Para razões de [MB]/[DNA] acima dos 0,125 a absorvância diminui sem que ocorra desvio no comprimento de onda, o que traduz uma interacção electrostática. Quando o valor de [MB]/[DNA] é abaixo de 0,125, a absorvância aumenta e ocorre o desvio de 9 nm para a zona do vermelho que apoia fortemente a existência de intercalação [7]. Neste caso tem-se uma razão de [MB]/[DNA]=0,07471, o que indica a ocorrência de intercalação com forma de ligação entre as moléculas.

No espectro da solução de DNA e MB, não são visíveis as bandas a 246 nm e 293 nm, uma vez que se encontram sobrepostos com a banda característica do DNA que apresenta uma absorvância maior. Para se poder analisar o decaimento dos valores de absorvância, estes foram representados em função do tempo de irradiação e obteve-se a figura 5.4.

**Figura 5.4** - Variação da intensidade normalizada a) da banda a 260 nm do espectro do DNA e do DNA+MB e b) e das bandas a 610nm e 669nm da solução de DNA e MB.

A intensidade da banda a 260 nm no espectro de DNA apresenta uma diminuição muito acentuada de cerca de 90% e, tendo em conta que esta banda é atribuída às bases, pode-se prever que ocorra desnaturação da dupla cadeia e consequente destruição das bases. Relativamente às bandas da solução de DNA e MB, os que sofrem uma diminuição mais acentuada de aproximadamente 90% são as bandas a 610 nm e 669 nm, ou seja, é o intercalante que sofre uma maior acção da luz UV, tal como se verifica na fig. 5.4 b).

Comparando o valor de absorvância da banda característica do DNA a 260 nm nas duas soluções (fig. 5.4 a)), tem-se que na solução onde está presente o intercalante, e como já foi referido, apenas diminuiu cerca de 50%, enquanto que na solução de DNA diminuiu 90%. Pode-se inferir que o intercalante impediu a acção da luz UV no DNA, prolongando o tempo necessário para degradar totalmente o DNA, tendo assim uma acção protectora.

Relativamente aos tempos de decaimento da solução de DNA é de aproximadamente 5,6 horas, enquanto que da solução de DNA+MB é de 6,5 horas. Assim tem-se que na solução de DNA+MB, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ das bases azotadas demoram mais tempo a serem degradadas do que no caso da solução sem o intercalante, indicando mais uma vez que o MB se encontra a proteger o DNA.

5.3 Efeito da radiação UV das bases do DNA

Com o objectivo de se analisar o que aconteceu quando as moléculas de DNA e de MB são sujeitas à radiação ultravioleta, estudou-se também o efeito do intercalante quando se encontra na presença das bases do DNA (adenina, timina, citosina e guanina). Pretende-se igualmente perceber quais as bases azotadas que sofrem uma maior acção do UV, e qual o papel do intercalante, nomeadamente se promove a destruição ou a protecção das bases e consequentemente do DNA.

Para se estudar o efeito do tempo de irradiação, foram preparadas soluções de adenina, timina e citosina com uma concentração de 0,08 mM e soluções de guanina com uma concentração de 5 mM, tendo em atenção os espectros de absorvância destas moléculas.

5.3.1 Caracterização espectrofotométrica

Da figura 5.5 à 5.8 encontram-se os espectros UV-Vis das soluções das diferentes bases com e sem azul de metileno irradiado com luz UV durante diferentes intervalos de tempo.

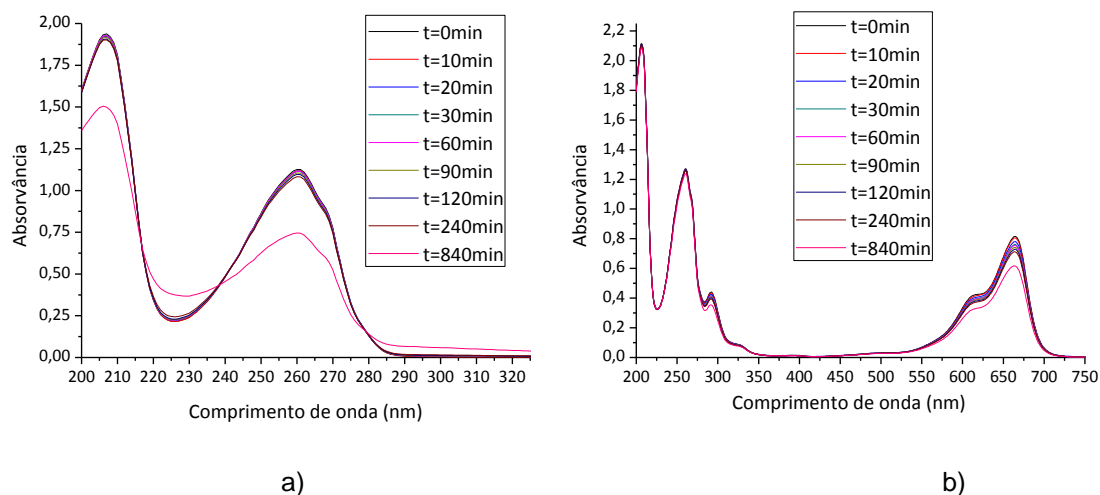


Figura 5.5 - Espectros de UV-Vis da base Adenina a) sem MB e b) com MB, após irradiada por UV por diversos períodos de tempo.

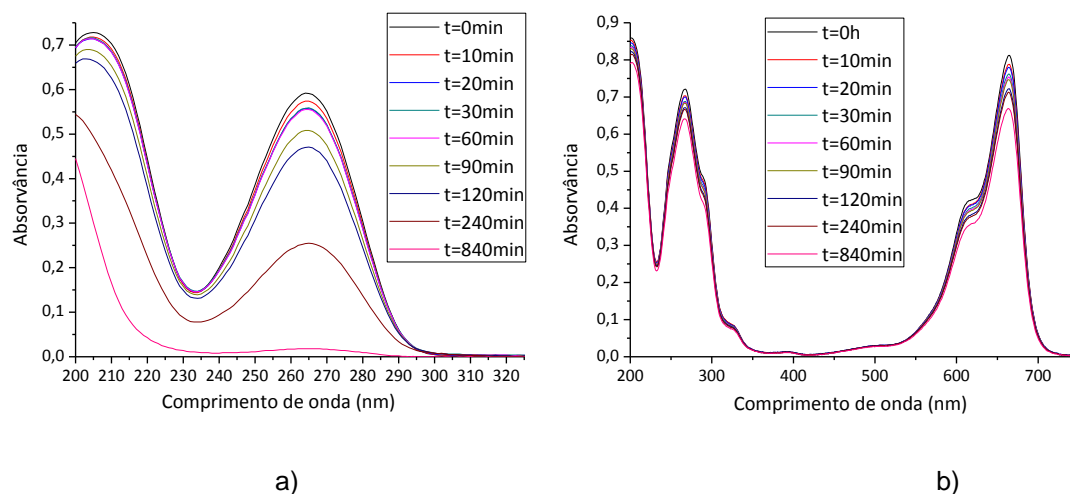


Figura 5.6 - Espectros de UV-Vis da base timina a) sem MB e b) com MB, após irradiada por UV por diversos períodos de tempo.

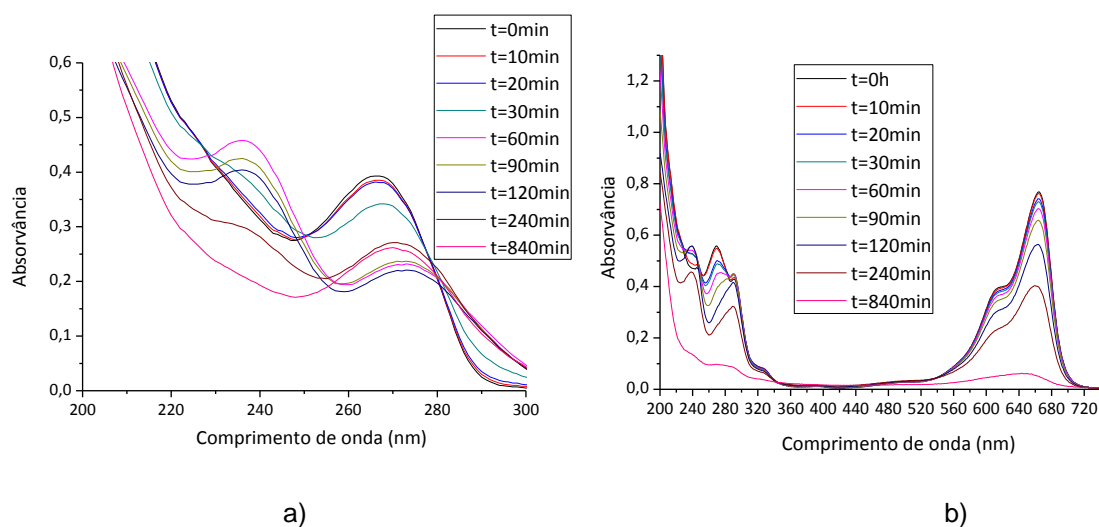


Figura 5.7 - Espectros de UV-Vis da base citosina a) sem MB e b) com MB, após irradiada por UV por diversos períodos de tempo.

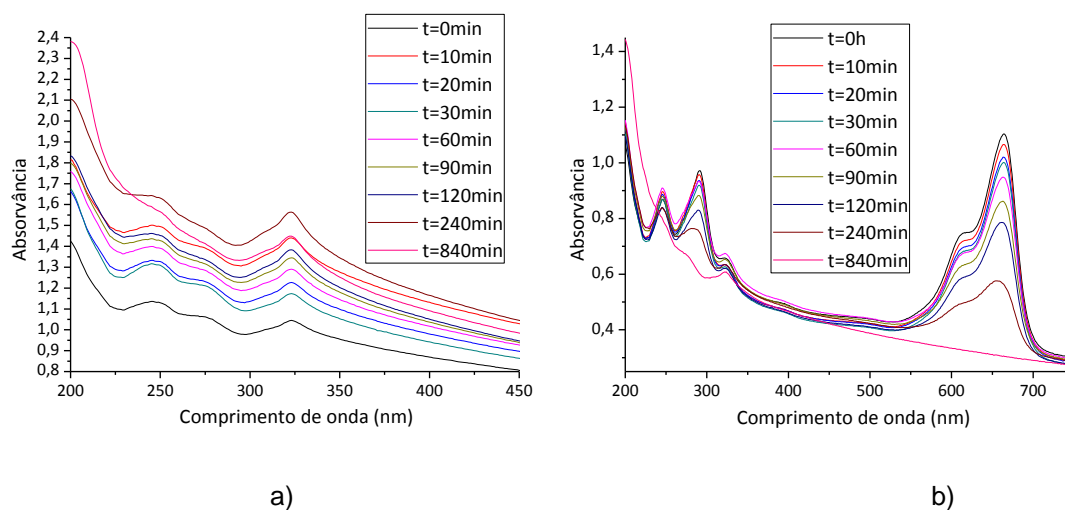


Figura 5.8 - Espectros de UV-Vis da base guanina a) sem MB e b) com MB, após irradiada por UV por diversos períodos de tempo.

5.3.1.1 Adenina

A base adenina, cujo espectro de absorção está representado na figura 5.5 a), apresenta duas bandas bem distintas aos 207 nm e 260 nm e ambos correspondem a transições electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$. A cerca dos 270 nm, também é visível uma banda pouco acentuada, que corresponde à mesma transição [27].

Através da análise dos espectros verifica-se que, ao expor a base adenina à luz ultravioleta, esta é degradada mais rapidamente quando não está na presença do intercalante, como se verifica na figura 5.9 b). Contudo, este aumento de rapidez de degradação não é muito elevado, correspondendo a uma subida de 30% em relação ao valor inicial. Na presença

do azul de metileno, a degradação é muito mais lenta e quase inexistente nas bandas características da base adenina sendo que apenas o azul de metileno sofre uma degradação mas pouco acentuada (fig 5.9 b)).

Ao longo da irradiação e das medições foi-se observando a coloração da solução, e não se verificou nenhuma atenuação na sua tonalidade azul característica do intercalante.

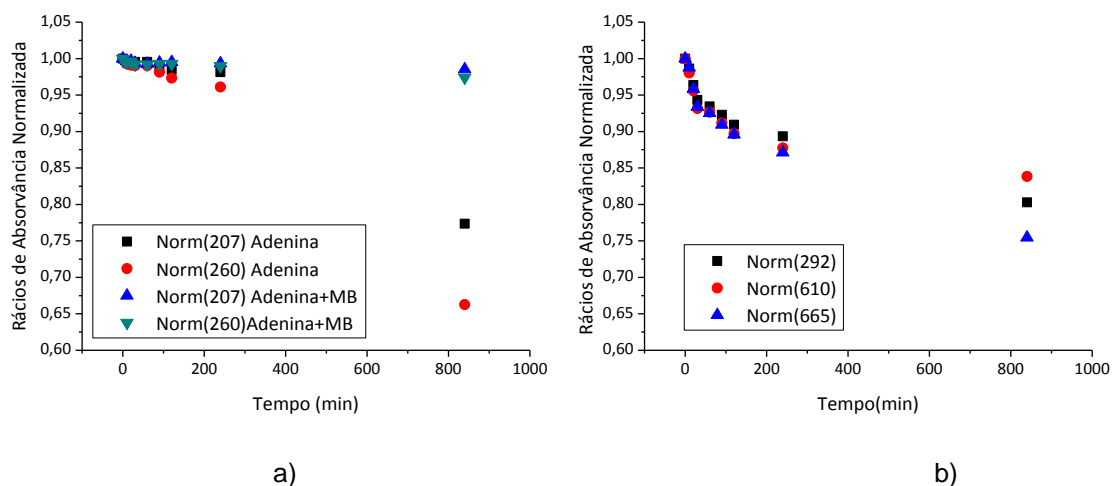


Figura 5.9 - Variação da intensidade das a) bandas características da base adenina ao longo do tempo (picos a 207 nm e 260 nm) com e sem MB e b) dos picos característicos do MB.

A adenina+MB apresenta um tempo de decaimento estimado de 38000 minutos para o pico a 260 nm. Apenas na presença da adenina, verifica-se que os pontos não têm um decaimento exponencial, logo não é possível estimar o seu tempo de decaimento.

5.3.1.2 Timina

De acordo com a figura 5.6 a), a timina, tal como a adenina, tem duas bandas características a 205 nm e a 264 nm que correspondem a transições electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$. [27] Estas transições, à medida que o tempo de irradiação aumenta, deixam de ocorrer quase na sua totalidade ao fim das 14 horas de exposição à luz UV, ou seja as moléculas de timina são degradadas. Por outro lado, tal como aconteceu com a base adenina na presença do azul de metileno, não se verificam alterações acentuadas, sendo que a diminuição que ocorre em todas bandas é entre os 5% e 15%, tal como se verifica na figura 5.10 b). Esta diminuição permite concluir que a base timina também é protegida da acção da luz UV pelo azul de metileno.

Relativamente à tonalidade da solução, esta também não sofreu alterações significativas durante a irradiação, o que indica que o intercalante também não se degradou. Contudo houve um ligeiro decréscimo nas intensidades dos seus picos característicos.

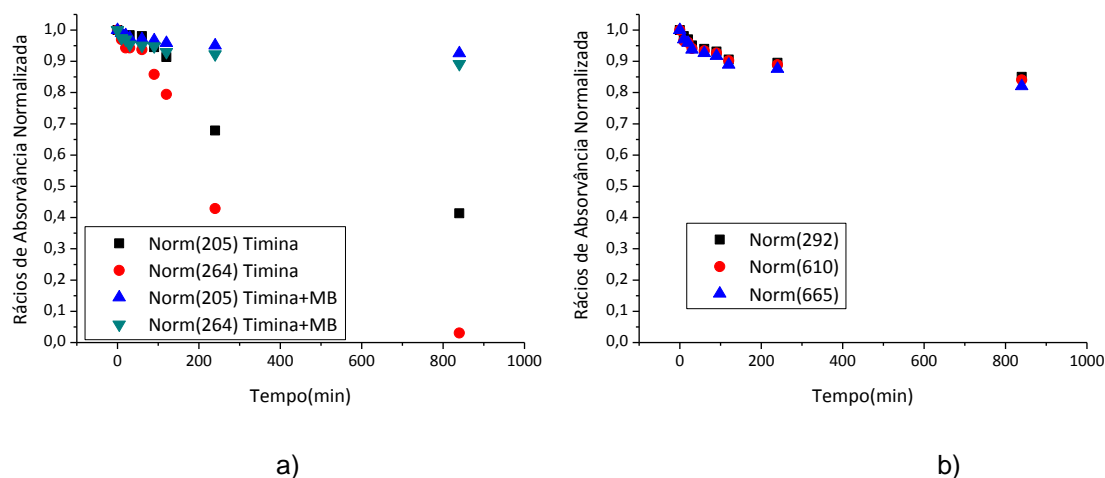


Figura 5.10 - Variação da intensidade a) das bandas características da base timina com e sem MB e b) das bandas características do MB ao longo do tempo.

Relativamente aos tempo de decaimento da base timina, temos que a base tem um tempo estimado de 330 minutos, enquanto que na presença do MB este tempo aumenta para 9300 minutos, cerca de 155 horas. Assim conclui-se que na presença do MB, a base timina demora mais tempo a ser degradada, tendo o MB um efeito protector.

5.3.1.3 Citosina

No espectro de absorvância da citosina (fig. 5.7 a)) foram identificadas três bandas com máximos de absorção nos comprimentos de onda 276, 241 e 227 nm, e estes correspondem a transições electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$. [40] A citosina, ao contrário das outras duas bases, sofre alterações acentuadas com a acção da luz UV. De acordo com Lapinski *et al*, a radiação UV induz o processo de fotoisomerização desta base, ou seja, induz a formação de 5 isómeros da citosina [41]. Contudo, não é possível afirmar que foi esse fenómeno que aconteceu durante este estudo e para tal seria necessário proceder a mais medições e a uma caracterização por infravermelho mais detalhada para analisar as ligações que mudaram.

Na presença do intercalante, verificam-se as mesmas alterações na zona dos 200 nm a 360 nm, sendo que após as 14 horas de irradiação, a base encontra-se praticamente degradada. O intercalante também sofreu a acção da luz UV, como se verifica no espectro na região dos 500 nm a 720 nm e na tonalidade da solução, que ao longo do tempo passou de um tom azul claro para um tom quase incolor.

Relativamente ao pico a 266 nm, é possível observar que este sofre um desvio de cerca de 10 nm durante o processo de exposição à radiação UV. Este deslocamento do máximo de absorvância para comprimentos de onda superiores denomina-se de efeito batocrómico. De acordo com a figura 5.11 a), este efeito ocorre nos primeiros 200 minutos de exposição, sendo que depois deste tempo, ocorre o desvio para comprimentos de onda inferiores. No que diz respeito à variação do valor de absorvância deste pico na ausência e presença do intercalante (fig.5.11 b)), verifica-se que na presença do intercalante a degradação da base é muito mais acentuada, do que quando apenas é irradiada a base.

Quanto ao intercalante, observa-se na figura 5.12 que este sofre uma degradação muito acentuada na presença da base e após a irradiação com luz UV.

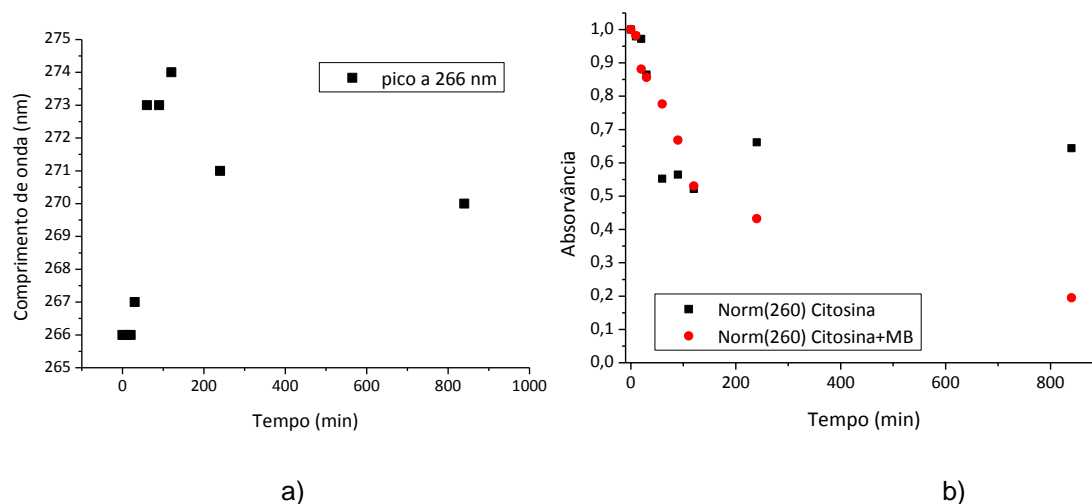


Figura 5.11 - Variação do comprimento de onda referente à banda de 266 nm da citosina, e variação do valor de absorvância da banda a 260 nm na ausência e presença do intercalante.

Nesta base não foi possível estimar o tempo de decaimento a 260 nm, sendo apenas possível determiná-lo para a presença do intercalante. Na presença do MB, esta base apresenta um tempo de decaimento estimado em 730 minutos a 246 nm.

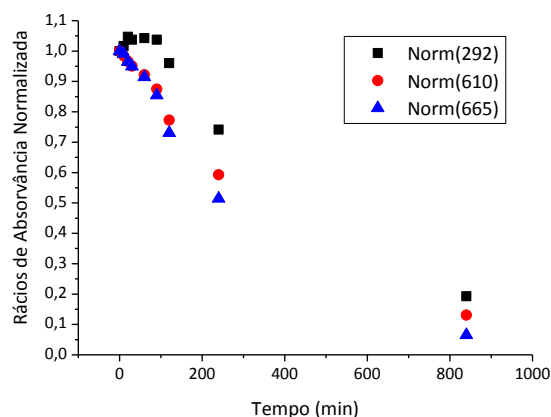


Figura 5.12 – Variação dos picos característicos do azul de metileno em solução de citosina em função do tempo de irradiação.

5.3.1.4 Guanina

No espectro inicial da guanina na figura 5.7 foram identificadas quatro bandas com máximos de absorção nos comprimentos de onda 260, 232, 218 e 202 nm, que correspondem a transições electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$, tal como nas restantes bases.[40] Através dos espectros obtidos, não é possível verificar se a base foi degradada ou não, mas pelo que é referido na literatura e no capítulo 2 desta dissertação, a luz UV induz a formação da molécula 8-oxoGua. Para comprovar tal facto, seria necessário caracterizar melhor os produtos da reacção através de mais medições e estudos.

Na presença do azul de metileno, observou-se a perda total de coloração da solução, passando de azul claro para incolor, o que indica degradação total do intercalante. Este facto também é comprovado pela diminuição de cerca de 70% das bandas com máximos de absorção. Também é visível um ligeiro decréscimo de intensidades de absorção nas bandas características da base guanina (322 nm), o que poderá indicar que ocorreu uma reacção desta com o intercalante e por conseguinte a sua degradação.

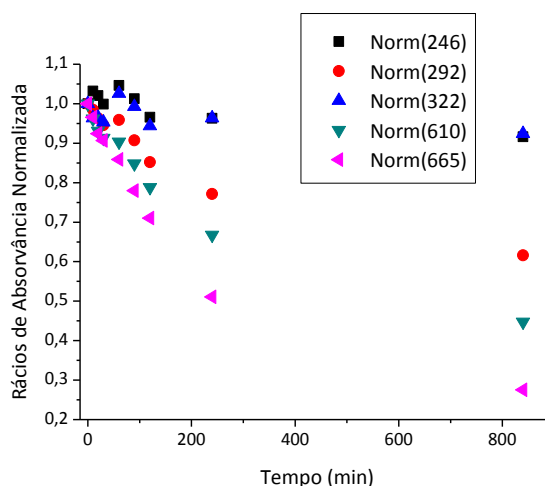


Figura 5.13 - Variação da intensidade das bandas de uma solução de base guanina e azul de metileno

Tal como para a citosina, para a base guanina também não foi possível estimar o seu tempo de decaimento. Contudo na presença do intercalante, o tempo de decaimento da base é de 7600 minutos, cerca de 127 horas até estar totalmente degradada.

5.3.2 Comparação de resultados

Na tentativa de se compilar os resultados obtidos, estudou-se o comportamento de picos específicos nas diversas amostras, com a irradiação por luz UV. Na figura 5.14 a) pode-se observar os rácios do pico a 260 nm sem a presença do intercalante, e verifica-se que a adenina neste pico é a que menos sofre com a acção da radiação UV, ao contrário do DNA e da timina. No caso da citosina, o decréscimo do pico a 260 nm tem um comportamento diferente devido ao que já foi anteriormente explicado. Contudo na fig.5.14 b) verifica-se que na presença do intercalante, a timina também é pouco afectada, tal como a adenina e guanina. Verifica-se que a citosina é a base que mais sofre a acção da luz UV na presença do intercalante. No caso do DNA e comparando os dois gráficos verifica-se que este é mais degradado no pico a 260 nm quando o intercalante não está presente, corroborando o facto deste ter uma acção protectora no DNA.

Lesões inteligentes em DNA

5 Caracterização por UV-Vis

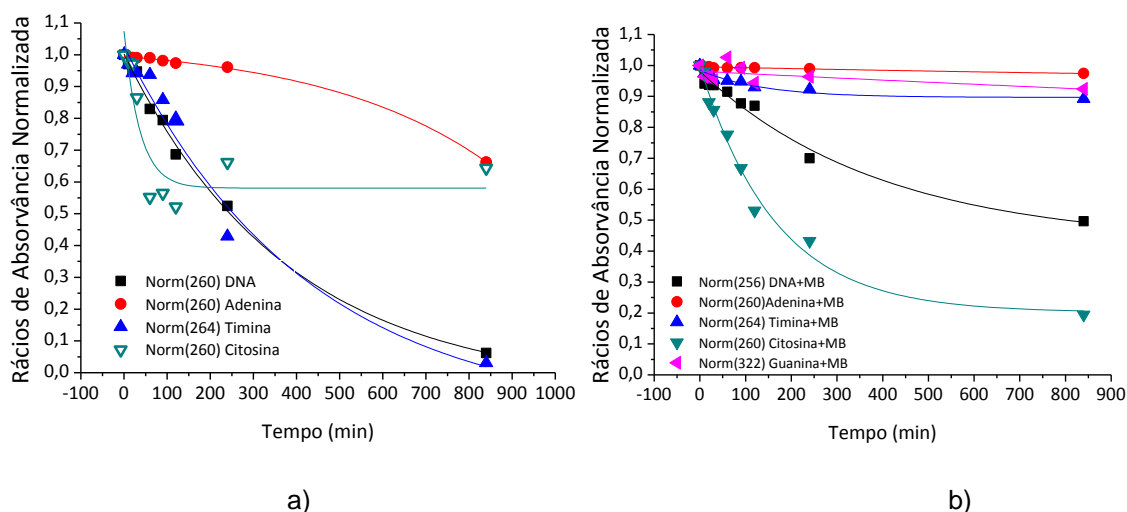


Figura 5.14 – Rácios de absorvância normalizada do pico a 260 nm da a) solução de DNA, adenina, timina e citosina e b) nas mesmas soluções, mais a guanina, mas com o intercalante MB.

Os dois picos característicos do MB, a 610 nm e 665 nm, apresentam o mesmo comportamento, ou seja, na presença da adenina e da timina, o MB é pouco degradado comparativamente ao MB isolado. Já na presença da base guanina, é degradado cerca de 50% do intercalante, contudo é na presença no DNA e da base citosina que o MB é mais degradado pela acção da radiação UV.

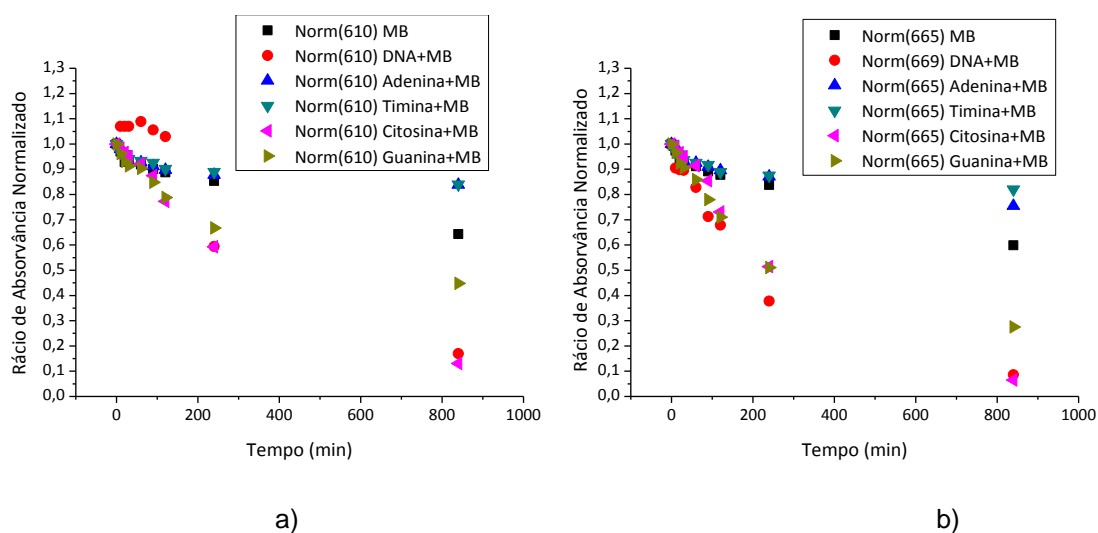


Figura 5.15 - Rácios de absorvância normalizada do pico a) a 610 nm e b) 665 nm do intercalante em soluções das quatro bases e de DNA.

Na figura 5.16 observa-se os rácios referentes à razão entre os dois picos acima estudados em função do tempo de irradiação, a razão 610nm/665nm. Nesta figura verifica-se que o rácio o DNA, citosina e guanina aumenta com o tempo de irradiação, o que indica que o pico a 665 nm decresce mais rapidamente que o pico a 610 nm, nestas amostras. Relativamente ao MB, adenina e timina, o rácio mantêm-se aproximadamente constante, o que indica que os picos 610 nm e 665 nm, decrescem pouco e com a mesma rapidez, ou seja, são pouco degradados pela radiação UV.

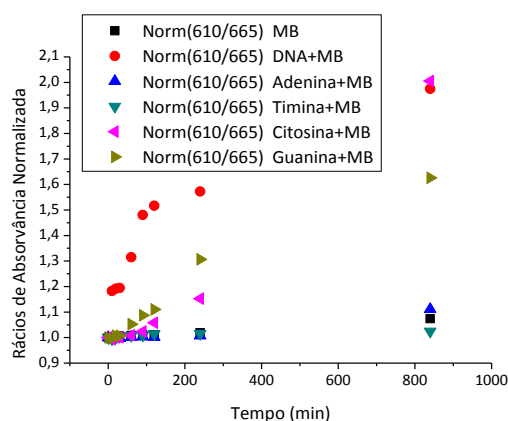


Figura 5.16 – Rátios de absorvância da razão entre os picos 610 nm e 665 nm para as diferentes amostras estudadas.

A tabela 5.3 resume os tempos de decaimento estimados dos principais picos de absorvância estudados nas diversas soluções de DNA, MB e bases. São os picos a cerca de 260 nm que corresponde ao pico do DNA, e aos picos a 294 nm, 610 nm e 669 nm que são os principais picos do azul de metileno. E quanto maior o tempo de decaimento de uma amostra, maior é o tempo que esta demorar a ser totalmente degradada pela radiação UV. Pela análise da tabela é possível verificar e corroborar o que foi dito anteriormente acerca do MB, que se degrada mais rapidamente na presença do DNA, uma vez que apresenta tempos de decaimento menores na sua presença.

A tabela 5.4 resume o decréscimo do pico a 260 nm partindo dos gráficos das figuras 5.11, e o comportamento das bases e DNA na ausência e presença do intercalante. É possível assim verificar o efeito do intercalante nas mesma, ou seja, o intercalante protege o DNA e as bases timina e adenina, degradando as outras duas bases, a citosina e a guanina.

Lesões inteligentes em DNA

5 Caracterização por UV-Vis

Tabela 5.3 – Tempos de decaimento, em minutos, dos principais picos de absorvância das diferentes soluções estudadas por UV-Vis.

Solução	τ do pico a cerca de 240 nm		$\tau_{292\text{ nm}}$ (min)	$\tau_{610\text{ nm}}$ (min)	$\tau_{669\text{ nm}}$ (min)
	c.d.o. (nm)	τ (min)			
MB	246	600±100	2300±270	2000±180	1750±140
DNA	260	340±16	--	--	--
DNA+MB	256	390±90	--	500±100	267±34
Adenina	--	--	--	--	--
Adenina+MB	260	38000±5000	4300±710	5700±1600	3200±490
Timina	264	330±50	--	--	--
Timina+MB	264	9300±2400	6000±100 0	5800±1000	5000 ±1000
Guanina	--	--	--	--	--
Guanina+MB	246	7600±2000	1700±200	960±120	480±65
Citosina	--	--	--	--	--
Citosina+MB	246	730±140	600±90	445±24	--

Tabela 5.4 – Resumo do decréscimo da intensidade do pico a 260 nm das bases azotadas e do DNA, e o respectivo tempo de decaimento, como também o efeito do intercalante.

	Sem MB		Com MB		Efeito do intercalante
	Tempo de decaimento (min)	Decréscimo da intensidade do pico (%)	Tempo de decaimento (min)	Decréscimo da intensidade do pico (%)	
DNA	340±20	95	390±90	50	Protecção
Adenina	--	34	38000±5000	2	Protecção
Timina	330±50	96	9000±3000	10	Protecção
Citosina	--	35	700±200	80	Degradação
Guanina	--	--	7600±2000	10	Degradação

5.4 Conclusão

Neste capítulo procedeu-se ao estudo do efeito da radiação UV em soluções aquosas de DNA, MB e das quatro bases do DNA, através da análise espectrofotométrica do UV-Vis. Relativamente ao azul de metileno, verificou-se que este é degradado pela acção da radiação UV, contudo quando intercalado no DNA, o complexo é pouco degradado. No caso do DNA isolado observou-se uma degradação de cerca de 90%, concluindo-se assim que o intercalante impede a acção da radiação UV no DNA, actuando como um protector.

No que diz respeito às bases, a adenina e a timina foram degradadas significativamente sem a presença do intercalante. Nas soluções em que o intercalante foi adicionado, verificou-se que estas bases são pouco degradadas, corroborando o que foi concluído acima.

As bases citosina e guanina sofreram danos significativos independentemente da presença ou não do intercalante, ou seja, nestas duas bases o MB não tem um efeito protector.

Lesões inteligentes em DNA

5 Caracterização por UV-Vis

.

6 Conclusão

6.1 Conclusão

Este trabalho tinha como objectivos principais estudar a influência da radiação UV no ácido desoxirribonucleico, bem como no complexo que este forma com o intercalante azul de metileno e com as bases do DNA isoladas, de forma a compreender como é que este intercalante pode provocar lesões no DNA, com o intuito de aumentar a destruição de células cancerígenas durante a irradiação e na presença do intercalante. De uma forma geral, estes objectivos foram concretizados e as principais conclusões são apresentadas de seguida.

A análise dos espectros FT-IR obtidos a partir de filmes de DNA e DNA+MB produzidos pela técnica de derramamento demonstrou que a acção do UV nestes filmes tem pouca influência, sendo que em presença de água, os resultados demonstraram a existência de alguns danos no DNA, nomeadamente a vibração do anel das adeninas e guaninas, torção da ligação N_7C_8H das mesmas e ainda vibrações na ligação $C=N$ do anel da guanina. Na estrutura do DNA verificou-se um aumento de ligações CC. Na presença do intercalante não foi possível concluir se existiram danos.

No procedimento seguinte, no qual as soluções foram irradiadas antes da preparação dos filmes, foi possível concluir que existe uma maior degradação do DNA após um longo intervalo de tempo de exposição à radiação UV e que a presença do intercalante tem pouca influência na acção da luz UV ao nível do DNA.

No estudo da região do UV-Vis realizado ao DNA e MB, concluiu-se que o intercalante tem efeito protector do DNA, prolongando o tempo necessário para este degradar totalmente o DNA. No que diz respeito às bases, a adenina e timina sofreram danos quando irradiadas com luz UV e na ausência do intercalante. Contudo na sua presença, os danos são mínimos. As outras duas bases, a citosina e a guanina, foram degradadas em ambas as situações, isto é, quer na presença quer na ausência do intercalante. No caso da citosina pode-se inferir que ocorreu um processo de fotoisomerização, ou seja, houve formação de 5 isómeros da citosina.

Relativamente à exposição do intercalante à radiação UV, este é degradado com o aumento do tempo de exposição e perde a sua coloração característica.

Este procedimento usado no UV-Vis, de simples execução e rápidos resultados, pode ser adaptado para o estudo do efeito de outros intercalantes e complementado com a espectrofotometria de FT-IR, possibilitando-nos uma melhor compreensão do que se verifica a nível do DNA e das suas bases.

Em suma, conclui-se que o intercalante azul de metileno tem uma acção mais protectora do que destruidora do DNA e suas bases.

6.2 Trabalhos futuros

Num trabalho futuro poderá ser estudado o efeito da radiação UV noutras condições atmosféricas, em que, por exemplo, a humidade e a temperatura possam ser variáveis, e também em diferentes concentrações de oxigénio. Seria igualmente interessante, do ponto de vista químico, estudar a variação do pH das soluções ao longo do tempo. Poderia também se fazer o estudo para baixas concentrações do intercalante uma vez que no corpo humano as concentrações não seriam tão elevadas como as estudadas nesta dissertação. Os filmes obtidos poderiam ainda ser alvo de uma análise mais aprofundada e detalhada através de outras técnicas, tais como espectroscopia de Raman, fluorescência e outras. Para além disto, seria importante alargar este estudo a outros intercalantes e aos seus efeitos no DNA após exposição à radiação UV.

7 Referências

1. Brown, S.B., E.A. Brown, and I. Walker, *The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment*. Lancet Oncol, 2004. **5**(497-508).
2. Kalka, K., H. Merk, and H. Mukhtar, *Photodynamic therapy in dermatology*. Journal of American Academy of Dermatology, 2000. **42**: p. 380-413.
3. Tardivo, J., et al., *Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2005. **2**(3): p. 175-191.
4. Ortiz, M., et al., *Elucidation of the mechanism of single-stranded DNA interaction with methylene blue: A spectroscopic approach*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2010. **218**: p. 26-32.
5. Wheatea, N.J., et al., *DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2007. **7**: p. 627-648.
6. Martínez, R. and L. Chacón-García, *The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work*. Current Medicinal Chemistry, 2005. **12**: p. 127-151.
7. Coelho, M., *Estudo do efeito da Radiação UV em filmes de ADN com intercalante*, in *Engenharia Biomédica*. 2008, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa: Lisboa.
8. Meteorologia, I.d. *A Radiação Ultravioleta*. 2008; Available from: http://www.meteo.pt/pt/enciclopedia/ambiente_atmosferico/radiacao_uv/index.html.
9. Gruijl, F.R.d. and H. Ananthaswamy, *Introdution to special issue on "biologic Effects of UV Radiation"*. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005. **571**(1).
10. Coohill, T.P., M.J. Peak, and J.G. Peak, *The effects of the ultraviolet wavelengths of radiation present in sunlight on human cells in vitro*. Photochemistry and Photobiology, 1987. **46**(6): p. 1043-1050.
11. Rouzaud, F., et al., *MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation*. Mutation Research, 2005. **571**: p. 133-152.
12. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular Structure of Nucleic Acids - A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 1953. **171**: p. 964-967.
13. Chistyakov, V.A., et al., *Methylene blue as a suppressor of the genotoxic effect of ultraviolet radiation with a wavelength of 300–400 nm*. Russian Journal of Genetics, 2009. **45**(3): p. 304-307.
14. Ravanat, J.-L., T. Douki, and J. Cadet, *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2001. **63**: p. 88-102.
15. Masschelein, W.J., *Ultraviolet Light in Water and Wastewater Sanitation*. 2002, United States of America: LEWIS PUBLISHERS.
16. Sonntag, C.v., *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair - A Chemical Perspective*. 2006, Alemanha: Springer.
17. Hader, D.-P. and R.P. Sinha, *Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact*. Mutation Research, 2005. **571**: p. 221-233.
18. Pfeifer, G.P., Y.-H. You, and A. Besaratinia, *Mutations induced by ultraviolet light*. Mutation Research, 2005. **571**: p. 19-31.

19. Melnikova, V.O. and H. Ananthaswamy, *Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer*. Mutation Research, 2005. **571**: p. 91-106.
20. Cadet, J., E. Sage, and T. Doukia, *Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA*. Mutation Research, 2005. **571**: p. 3-17.
21. Li, S., et al., *Stacking Interactions and DNA Intercalation*. J. Phys. Chem., 2009. **113**: p. 11166-11172.
22. *Interaction of Ru(II) Complexes and DNA*. 2011; Available from: <http://www.photobiology.com/photoiupac2000/pierard/Interactionmain.html#anchor1012623>.
23. Wang, J. and X. Yang, *Multiplex binding modes of toluidine blue with calf thymus DNA and conformational transition of DNA revealed by spectroscopic studies*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2009. **74**(2): p. 421-426.
24. Rohs, R., et al., *Methylene Blue Binding to DNA with Alternating GC Base Sequence: A Modeling Study*. J. Am. Chem., 2000. **122**: p. 2860-2866.
25. Floyd, R., J. Schneider, and D. Dittmer, *Methylene blue photoinactivation of RNA viruses*. Antiviral Research, 2004. **61**(3): p. 141-151.
26. Vollhardt, K.P.C. and N.E. Schore, *Organic Chemistry - Structure and Function*. 4th. Ed ed. 2002, United States of America: Freeman.
27. Costa, A.M., *Caracterização de filmes finos de Adenina e Timina por Radiação UV-Vísivel*, in *Engenharia Biomédica*. 2007, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa: Lisboa.
28. Duarte, A., *Espectroscopia Vibracional - Infravermelho (IV)*, FCT-UNL.
29. Mota, C., *Desenvolvimento de um Sistema Para Irradiação por Ultra-Violeta de Biomoléculas*, in *Engenharia Biomédica*. 2011, Universidade Nova de Lisboa: Lisboa.
30. Banat, F., et al., *Photodegradation of methylene blue dye by the UV/H₂O₂ and UV/acetone oxidation processes*. Desalination, 2005. **181**(1-3): p. 225-232.
31. Sigma-Aldrich. 2011; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/>.
32. Hossain, M. and G. Suresh Kumar, *DNA intercalation of methylene blue and quinacrine: new insights into base and sequence specificity from structural and thermodynamic studies with polynucleotides*. Molecular BioSystems, 2009. **5**(11): p. 1311.
33. Gomes, P.J., et al., *UV degradation of deoxyribonucleic acid*. Polymer Degradation and Stability, 2009. **94**: p. 2134-2141.
34. Banyay, M., M. Sarkar, and A. Graslund, *A library of IR bands of nucleic acids in solution*. Biophysical Chemistry, 2003. **104**: p. 477-488.
35. Somani, P.R., et al., *Thermal degradation properties of solid polymer electrolyte (poly(vinyl alcohol)+phosphoric acid)/methylene blue composites*. Polymer Degradation and Stability, 2003. **79**: p. 77-83.
36. Yu, Z. and S.S.C. Chuang, *Probing Methylene Blue Photocatalytic Degradation by Adsorbed Ethanol with In Situ IR*. J. Phys. Chem., 2007. **111**: p. 13813-13820.
37. Heger, D., J. Jirkovsky, and P. Klán, *Aggregation of Methylene Blue in Frozen Aqueous Solutions Studied by Absorption Spectroscopy*. J. Phys. Chem., 2005. **109**: p. 6702-6709.
38. Ong, S.-A., et al., *Treatment of methylene blue-containing wastewater using microorganisms supported on granular activated carbon under packed column operation*. Environ Chem Lett, 2006. **5**: p. 95-99.

39. Tayade, R.J., T.S. Natarajan, and H.C. Bajaj, *Photocatalytic Degradation of Methylene Blue Dye Using Ultraviolet Light Emitting Diodes*. Ind. Eng. Chem. Res., 2009. **48**: p. 10262–10267.
40. Oliveira, S., *Estudo dos efeitos da Radiação UV de baixa energia em bases de DNA e RNA*, in *Engenharia Biomédica*. 2007, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa: Lisboa.
41. Lapinski, L., et al., *Five isomers of monomeric cytosine and their interconversions induced by tunable UV laser light*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(20): p. 9676.